

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**ANÁLISIS DE LOS FACTORES
SOLUBLES ANGIOGÉNICOS EN LA
ENFERMEDAD DE CROHN**

TESIS DOCTORAL

INÉS DUEÑAS POUSA

Madrid, 2009



El trabajo titulado “Análisis de los factores solubles angiogénicos en la enfermedad de Crohn” recogido en la presente memoria ha sido realizado por INÉS DUEÑAS POUSA, bajo la dirección del Dr. José Maté Jiménez, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y del Dr. Javier Pérez Gisbert, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Opta al grado de Doctor

INÉS DUEÑAS POUSA

VºBº El Director
Fdo: José Maté Jiménez

VºBº El Director
Fdo: Javier Pérez Gisbert

JOSÉ MATÉ JIMÉNEZ, JEFE DE SECCIÓN del SERVICIO DE APARATO DIGESTIVO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA, y **JAVIER PÉREZ GISBERT**, MÉDICO ADJUNTO del SERVICIO DE APARATO DIGESTIVO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA, Directores de la Tesis presentada por Doña INÉS DUEÑAS POUSA.

INFORMAN:

Que Doña INÉS DUEÑAS POUSA ha realizado bajo su dirección y tutela el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Medicina titulado “ANÁLISIS DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS EN LA ENFERMEDAD DE CROHN”, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral.

Este trabajo ha generado varios artículos en revistas internacionales y comunicaciones a congresos nacionales e internacionales, tanto en forma de *abstract* como de presentaciones orales. El trabajo alcanza los objetivos planteados, aporta datos originales y plantea nuevas preguntas en el estudio de la patogenia de la enfermedad de Crohn. Por todo ello, se considera que el trabajo presentado es merecedor de ser aceptado como trabajo de Tesis Doctoral en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid, a 14 de abril de 2009

Fdo: José Maté Jiménez

Fdo: Javier Pérez Gisbert

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario de La Princesa, bajo la dirección del Dr. José Maté Jiménez y Dr. Javier Pérez Gisbert. Esta tesis ha sido realizada gracias a la financiación concedida por Schering-Plough y el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD).

A Miguel, mi gran apoyo en la vida.
A mis queridos padres Pablo y María y hermana Raquel por el cariño
y la confianza que siempre me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A Javier P. Gisbert y José Maté porque siempre me han animado con cada trabajo realizado y me han proporcionado todos los medios disponibles a su alcance para llevar a cabo esta tesis y los trabajos generados de ella. En esta tesis va mucho de lo aprendido gracias a ellos. Muchas gracias por todo.

Mi más sincero agradecimiento a Ricardo Moreno, la primera persona que sin ver beneficio propio me ayudó a buscar un hueco en la vida laboral dentro del hospital y siempre me ha tendido una mano.

A Carlos Gamallo, que con sus palabras hizo que siempre supiera donde estaba, y lo que podía exigirme a mí misma. Y que sin ponernos de acuerdo, supo hacer que luchara más.

A Xamila Salcedo por sus palabras de ánimo y por haber hecho más fácil el comienzo de este trabajo.

A todos las enfermeras y auxiliares, residentes, adjuntos y administrativos del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario de la Princesa, por su compañerismo y apoyo. Sin ellos la realización de este trabajo hubiera tenido muchos obstáculos.

A los técnicos, doctorandos, y post-doctorales de la 9ª planta del Hospital Universitario de la Princesa que me han apoyado en la parte práctica del presente trabajo, y en concreto a Paloma Sanz.

A mis compañeras y amigas de la carrera, Gabi, Paloma, Marga, Elvira, María José, Nieves e Irene, porque han creído en mis posibilidades.

Agradezco a Beatriz Becerro de Bengoa sus ánimos, sus consejos y su alegría.

RESUMEN

RESUMEN

La angiogénesis, o la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, es un proceso íntimamente relacionado con la inflamación y la fibrosis. Por su parte, la enfermedad de Crohn (EC) se caracteriza por inflamación crónica, ulceración y regeneración de la mucosa del intestino y puede manifestarse fenotípicamente con un comportamiento inflamatorio, estenosante o fistulizante.

Por ello, nuestra hipótesis fue evaluar si los mediadores angiogénicos solubles difieren entre pacientes con EC en remisión y controles sanos, y según el patrón fenotípico en los pacientes con EC.

Con este fin se estudiaron 70 pacientes con EC en remisión divididos en tres grupos según su patrón de evolución (inflamatorio, estenosante y fistulizante); y 44 controles sanos. Mediante ELISA, se determinaron las concentraciones séricas de diversos factores angiogénicos: factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PlGF), y su receptor común (VEGFR1), las angiopoietinas (Ang1 y Ang2) y su receptor común (Tie2).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los niveles de mediadores angiogénicos en pacientes con EC en remisión y controles sanos. Esto podría sugerir que la activación del proceso angiogénico en estos pacientes no está únicamente ligada a la inflamación. El proceso angiogénico podría ser por sí solo una consecuencia de la enfermedad y a su vez la causa, debido a una retroalimentación entre los procesos de inflamación crónica y angiogénesis.

Asimismo, cuando se analizaron las concentraciones séricas de los factores angiogénicos en los pacientes con EC en función de sus patrones fenotípicos no se observaron diferencias estadísticamente significativas. A partir de estos resultados podría cuestionarse el uso de los niveles séricos de los factores angiogénicos como posibles marcadores biológicos, que ayudasen a estratificar el comportamiento de la enfermedad y seleccionar de forma precoz el tratamiento más adecuado. No obstante, debido a que se observó una tendencia a una mayor concentración del VEGF y de la Ang2 en pacientes con un patrón fenotípico estenosante, son necesarios futuros estudios con una mayor cohorte de pacientes.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

aa	Aminoácido
Ang	<i>Angiopoietin</i> . Angiopoietina
CDAI	<i>Crohn's Disease Activity Index</i> . Índice de actividad de la enfermedad de Crohn
CE	Células Endoteliales
EC	Enfermedad de Crohn
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i> . Factor inducible por hipoxia
MMP	<i>Matrix Metalloproteinases</i> . Metaloproteinasas de la matriz extracelular
PI3K	<i>Phosphatidil Inositol 3 Kinase</i> . Fosfatidil Inositol 3 Cinasa
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i> . Factor de crecimiento placentario
Tie	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains</i> . Receptor de las Angiopoietinas
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> . Factor de necrosis tumoral
tPA	<i>Tissue Plasminogen Activator</i> . Activador de plasminógeno tisular
uPA	<i>Urokinase Plasminogen Activator</i> . Activador de plasminógeno tipo urocinasa
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> . Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> . Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

ÍNDICE

ÍNDICE

<i>INTRODUCCIÓN</i>	2
1. ENFERMEDAD DE CROHN	2
2. ANGIOGÉNESIS	7
2.1. FACTORES ANGIOGÉNICOS	9
2.1.1. FAMILIA GÉNICA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)	11
2.1.1.1. VEGF.....	13
2.1.1.2. FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO (PIGF)	19
2.2.1.3. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGFR1)	20
2.1.2. FAMILIA GÉNICA DE LAS ANGIOPOIETINAS (Ang)	22
2.1.2.1. ANGIOPOIETINA 1	22
2.2.2.2. ANGIOPOIETINA 2	23
2.2.2.3. RECEPTOR DE LAS ANGIOPOIETINAS, TIE2.....	24
3. ANGIOGÉNESIS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	26
3.1. ACTIVACIÓN DEL PROCESO ANGIOGÉNICO.....	27
3.2. CAMBIOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR Y DEGRADACIÓN DE LA MEMBRANA BASAL DE LA MICROVASCULATURA INTESTINAL.	29
3.3. PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN Y ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES.	30
3.4. REMODELACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LA NUEVA MICROVASCULATURA INTESTINAL.	31
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	34
1. OBJETIVOS PRIMARIOS	34
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	35
<i>SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS</i>	37
1. PACIENTES Y CONTROLES	37
2. DISEÑO DEL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN	38
3. DEFINICIONES	40
4. DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS ..	41

5. ESTUDIO ESTADÍSTICO	42
<i>RESULTADOS</i>	45
1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	45
1.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE PACIENTES Y CONTROLES	45
1.1.1. Edad	45
1.1.2. Sexo	45
1.1.3. Tabaco.....	45
1.2. DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE PACIENTES	46
1.2.1. Años de evolución	46
1.2.2. Semanas en remisión	46
1.2.3. Antecedentes familiares	46
1.2.4. Apendicectomizados	47
1.2.5. Colectomizados/Hemicolectomizados	47
1.2.6. Manifestaciones extraintestinales	47
1.2.7. Alergias.....	48
1.2.8. Clasificación de Viena según edad de diagnóstico	48
1.2.9. Clasificación de Viena según la localización.....	48
1.2.10. Clasificación de Viena según en comportamiento fenotípico de la enfermedad.....	48
1.2.11. Fístulas	49
1.2.12. Tratamiento.....	49
2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA	51
2.1. FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS EN PACIENTES CON EC Y CONTROLES.	51
2.2. FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS SEGÚN EL PATRÓN EVOLUTIVO DE LOS PACIENTES CON EC.	52
2.3. FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS SEGÚN LA EDAD DE DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES CON EC.	55
2.4. FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS SEGÚN LA LOCALIZACIÓN DE LA EC.....	56
2.5. FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS SEGÚN DIVERSAS VARIABLES EN PACIENTES CON EC.....	57
2.6 CORRELACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS.....	58
2.7. RELACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS Y LOS REACTANTES DE FASE AGUDA (PROTEÍNA C REACTIVA, OROSOMUCOIDE Y FIBRINÓGENO).	59
2.8. RELACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS Y LAS CONCENTRACIONES DE TIPOS CELULARES CIRCULANTES (PLAQUETAS, NEUTRÓFILOS, LINFOCITOS).....	60

<i>DISCUSIÓN</i>	62
1. COMPARACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS ENTRE PACIENTES CON EC EN REMISIÓN Y CONTROLES.	62
2. COMPARACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS EN PACIENTES CON EC EN REMISIÓN CLASIFICADOS SEGÚN SU PATRÓN FENOTÍPICO.	66
3. EVALUACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS EN PACIENTES CON EC EN REMISIÓN SEGÚN VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS.	67
4. RELACIÓN DE LOS REACTANTES DE FASE AGUDA Y TIPOS CELULARES CIRCULANTES CON LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS.	71
<i>CONCLUSIONES</i>	75
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	77
<i>PUBLICACIONES</i>	91
1. ARTÍCULOS PUBLICADOS	91
2. COMUNICACIONES A CONGRESO	92
<i>ANEXO</i>	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Viena de la enfermedad de Crohn ¹³	4
Tabla 2. Índice de actividad para la enfermedad de Crohn (CDAI) ¹³	5
Tabla 3. Familia de genes de VEGF/PIGF.....	11
Tabla 4. Descriptivo de la edad de los pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos.....	45
Tabla 5. Frecuencia del sexo de los pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos.....	45
Tabla 6. Frecuencia del hábito tabáquico de los pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos.....	45
Tabla 7. Descriptivo de los años de evolución de la enfermedad estratificado.....	46
Tabla 8. Descriptivo de los años de evolución de la enfermedad.	46
Tabla 9. Frecuencia de la muestra según las semanas que llevan en remisión de la enfermedad. ..	46
Tabla 10. Frecuencia de antecedentes de la enfermedad.	46
Tabla 11. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que han sido apendicectomizados..	47
Tabla 12. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que han sido operados del colon. ...	47
Tabla 13. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que presentan manifestaciones extraintestinales.....	47
Tabla 14. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que tienen alergia	48
Tabla 15. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn clasificados según la edad de diagnóstico.	48
Tabla 16. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn clasificados según la localización de zona afectada.....	48
Tabla 17. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn clasificados según el patrón evolutivo de la enfermedad.	48
Tabla 18. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn con fístulas.....	49
Tabla 19. Frecuencia del tipo de fístulas en pacientes con enfermedad de Crohn.....	49
Tabla 20. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que reciben tratamiento.....	50
Tabla 21. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que reciben tratamiento con aminosalicilatos.....	50

Tabla 22. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que reciben tratamiento con inmunomoduladores.	50
Tabla 23. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que reciben tratamiento con corticoides.	50
Tabla 24. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos en pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos	51
Tabla 25. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos en pacientes con enfermedad de Crohn clasificados según su patrón fenotípico de la enfermedad.....	52
Tabla 26. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos en pacientes con enfermedad de Crohn estratificados según los años de evolución.	53
Tabla 27. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos según el hecho de tener fístulas.	54
Tabla 28. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos según el tipo de fístula.	54
Tabla 29. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos según la edad de diagnóstico de la enfermedad.	55
Tabla 30. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos según la localización de la enfermedad.....	56
Tabla 31. Concentraciones de los reactantes de fase aguda de pacientes con enfermedad de Crohn en remisión y controles sanos.....	59
Tabla 32. Concentraciones de los tipos celulares circulantes en pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles diferencias en la activación y desarrollo de una angiogénesis fisiológica o patológica.	10
Figura 2. Unión de los miembros de la familia génica del factor de crecimiento del endotelio vascular con sus receptores en las células endoteliales.	12
Figura 3. Isoformas del gen VEGF-A.	14
Figura 4. Etapas del proceso angiogénico.	26

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE CROHN

La enfermedad de Crohn (EC) es un proceso panentérico inflamatorio de inicio y predominio submucoso, transmural, granulomatoso y cicatrizante, que puede afectar a cualquier segmento del tubo digestivo desde la boca hasta el ano, de forma segmentaria o discontinua¹. La EC presenta determinados patrones clínicos que cursan con una naturaleza focal, y ocasionalmente granulomatosa, de las lesiones microscópicas. Su carácter transmural y cicatricial explica el desarrollo frecuente de fístulas, abscesos y estenosis¹.

En la actualidad existe un conocimiento limitado acerca de la etiopatogenia de la enfermedad. Se considera probable la implicación de factores desencadenantes ambientales de naturaleza aún no determinada, aunque entre ellos podrían encontrarse las infecciones o algún componente de la dieta². En pacientes genéticamente predispuestos, en la mucosa intestinal se iniciaría y perpetuaría una compleja respuesta inmunitaria, exagerada e incontrolada³. Parece que el gen NOD2/CARD15 se encuentra mutado en gran parte de pacientes con EC; este hallazgo es muy relevante porque ha ayudado a aclarar la patogenia de la enfermedad y el papel que la susceptibilidad genética puede jugar en su desarrollo⁴.

Las tasas de incidencia y prevalencia de la EC parecen haber sufrido un notable incremento en los países más desarrollados y entre la población más joven⁵. Esto ha sugerido que los factores ambientales, y por tanto, los distintos estilos de vida podrían desempeñar un papel importante en la etiología de esta enfermedad^{2, 6}.

En el curso natural de la enfermedad se alternan frecuentemente brotes de actividad inflamatoria o recidivas con periodos de inactividad o remisión, y existe una elevada tendencia a la recurrencia tras la resección quirúrgica de los tramos afectados^{7, 8}.

La enfermedad suele manifestarse con alteraciones digestivas inespecíficas que aparecen con carácter recurrente, generalmente en pacientes jóvenes⁹. Los síntomas más frecuentes son el dolor abdominal y la diarrea, aunque también pueden presentarse rectorragia, pérdida de peso con déficit nutricional, fiebre, dolores articulares y afectación anal, entre otros⁷.

Ya que no existen criterios patognomónicos, el diagnóstico de la EC se realiza con el conjunto de datos clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos, estos últimos a partir de biopsia o piezas quirúrgicas. Como complemento a la valoración clínica, puede ser útil la determinación de ciertos parámetros analíticos (proteína C reactiva, orosomucoide, fibrinógeno), que dan una idea del grado de inflamación¹⁰.

La EC es clínicamente muy heterogénea y con una importante variedad demográfica, clínica y fenotípica lo que ha obligado a subclasificar a los pacientes. De acuerdo con la clasificación de Viena¹¹, modificada recientemente por la clasificación propuesta en Montreal¹², se definen varios patrones clínicos de

la enfermedad en función de la edad de diagnóstico, de la localización, y de la evolución o el comportamiento (*tabla 1*).

Edad al diagnóstico (A)	
A1	17 – 40 años
A2	> 40 años
Localización (L)	
L1	Íleon terminal
L2	Colon
L3	Ileocólica
L4	Tracto digestivo alto
Patrón clínico (B)	
B1	Inflamatorio
B2	Estenosante
B3	Fistulizante

Tabla 1. Clasificación de Viena de la enfermedad de Crohn¹³.

El patrón evolutivo o de comportamiento de la enfermedad se relaciona con el grado de afectación transmural y refleja más fielmente la variedad de comportamientos clínicos, su agresividad y la necesidad de cirugía. Como refleja la tabla 1, la clasificación de Viena propone tres patrones evolutivos.

Con el propósito de cuantificar la actividad inflamatoria, múltiples índices han sido diseñados, especialmente, desde el punto de vista clínico. Uno de los más utilizados es el *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI), que incluye ocho variables independientes, siete de ellas clínicas, y sólo un parámetro analítico (*tabla 2*).

Días	1	2	3	4	5	6	7	x Factor	Subtotal
Nº de heces líquidas o muy blandas								x 2	
Dolor abdominal (no=0, leve=1, moderado=2, grave=3)								x 5	
Estado general (bueno=0, regular=1, malo=2, muy malo=3, terrible=4)								x 7	
Nº de las siguientes manifestaciones clínicas: Artritis/artralgia Iritis/uveítis Eritema nodoso/pioderma/aftas Fisura anal/fistula/absceso Otras fistulas Fiebre>38.5 en la última semana								x 20	
Toma de antidiarreicos (no=0, sí=1)								x 30	
Masa abdominal (no=0, dudosa=1, sí=2)								x 10	
Hematocrito (47%: varones, 43%: mujeres)								x 6	
Peso corporal (1-peso normal)x100								x 1	
	CDAI TOTAL								
CDAI < 150 = No activo									
CDAI 150-250 = brote leve									
CDAI 250-350 = brote moderado									
CDAI > 350 = brote grave									

Tabla 2. Índice de actividad para la enfermedad de Crohn (CDAI)¹³.

Dado que en la EC no existe buena correlación entre la actividad clínica y los parámetros de laboratorio, hallazgos radiológicos y lesiones endoscópicas, se acepta que el tratamiento deba adecuarse, principalmente, en función de la sintomatología. La estratificación de la actividad en la EC en grado inactivo, leve, moderado o grave determina las diferentes estrategias terapéuticas^{7, 14}.

Aunque la EC es un proceso crónico e incurable, existen en la actualidad diferentes opciones de tratamiento médico y quirúrgico que se emplean con el fin de conseguir la remisión completa de la enfermedad y mantenerla, además de evitar las complicaciones que pudieran surgir y tratarlas. Así, la selección de un tratamiento dependerá de la localización, la extensión, el grado de actividad

inflamatoria, el patrón evolutivo de la enfermedad, las complicaciones locales o extraintestinales, así como del comportamiento y respuesta a terapias previas¹⁵.

El tratamiento médico estará enfocado a inducir la remisión clínica, conseguir la curación de las lesiones mucosas, prevenir la recidiva a largo plazo y prevenir las complicaciones¹⁶.

Entre los tratamientos utilizados están los aminosalicilatos, los corticosteroides, los antibióticos, los inmunomoduladores y las terapias biológicas¹. Los aminosalicilatos son uno de los grupos farmacológicos más ampliamente prescritos en la EC, sin embargo, en la actualidad existe un intenso debate sobre su eficacia real. Por su parte, los corticoides son el tratamiento de elección en los brotes de exacerbación moderados y graves. En caso de los antibióticos, hay datos preliminares que sugieren que la combinación de metronidazol con ciprofloxacino podría ser eficaz, pero no hay ninguna evidencia concluyente para justificar su recomendación general⁹. Respecto a los inmunomoduladores, la azatioprina o la 6-mercaptopurina y el metrotexato, así como la terapia biológica anti-TNF por excelencia, el infliximab, han demostrado eficacia en el mantenimiento de la remisión, además de estar indicados si el paciente presenta criterios de corticorrefractoriedad, corticorresistencia, enfermedad fistulizante o enfermedad perianal refractaria a otros tratamientos.

La mayoría de los pacientes con EC requerirá de al menos una cirugía en el transcurso de su vida. Del 75 al 90% de los pacientes serán intervenidos después de 20 y 30 años de evolución de los síntomas respectivamente¹⁷. Sin embargo, debido al avance y desarrollo en el tratamiento farmacológico, durante los últimos años, la cirugía cuenta con menos indicaciones como tratamiento de primera línea de la enfermedad y presenta un enfoque más conservador¹⁸.

2. ANGIOGÉNESIS

Se denomina angiogénesis (o neoangiogénesis) al proceso biológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de otros preexistentes¹⁹.

Los vasos sanguíneos están constituidos por diversos tipos celulares que facilitan su función, que es principalmente la de abastecer de nutrientes y oxígeno a los tejidos del organismo y mantener el equilibrio homeostático del mismo²⁰:

- Células endoteliales (CE): se disponen en forma monoestratificada plana, son de origen mesodérmico y están en contacto con la sangre.
- Lámina basal: sobre la cual están asentadas las CE.
- Pericitos y células del músculo liso: se encargan de la contracción y dilatación de los vasos, es decir, de la plasticidad de la microvasculatura.

La angiogénesis es un fenómeno fisiológico que tiene lugar durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo, el ciclo reproductivo de la mujer y la cicatrización de las heridas²¹.

Sin embargo también es un proceso fundamental en enfermedades neoplásicas (para el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica) y en enfermedades no neoplásicas, generalmente con carácter inflamatorio, tales como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética, la degeneración macular en edad avanzada, la psoriasis o incluso las enfermedades inflamatorias intestinales²²⁻²⁴.

Aunque podría parecer obvia la asociación entre la inflamación y la angiogénesis, el tipo de relación entre estos dos procesos es aún desconocido²⁰. En la artritis reumatoide, los nuevos vasos pueden llegar a destruir el cartílago²⁵. En la

retinopatía diabética, la nueva formación de vasos sanguíneos en la retina podría invadir el vítreo, producir sangrado y causar ceguera²². En la degeneración macular asociada a la edad, la neovascularización aberrante puede dar lugar a la destrucción de la arquitectura retiniana normal. También la patogénesis de la psoriasis²⁶ y enfermedades cardiovasculares han sido relacionadas con la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes^{22, 24}. Debido a la relación entre estos trastornos y las enfermedades inflamatorias intestinales, parece interesante plantearse la posible implicación de la angiogénesis en la patogénesis de la EC.

Como consecuencia fisiológica de la inflamación crónica y del daño epitelial, sucesos a los cuales está sometida de manera continua la mucosa intestinal en la EC, se produciría un desequilibrio de la homeostasis microvascular local²⁷. De manera que mediante una activación del proceso angiogénico, el tejido dañado sería abastecido de oxígeno, nutrientes y tipos celulares circulantes que facilitarían la regeneración epitelial. Sin embargo, este proceso principalmente fisiológico, podría derivar a un proceso patológico gracias a la sobreexpresión o infraexpresión de determinadas citocinas, factores de crecimiento y células anómalas. Así, en el caso de la EC, un desequilibrio patológico de la homeostasis microvascular de la mucosa del segmento del tracto digestivo afectado, reflejado por una alteración en la expresión de factores que regulan la neoangiogénesis, podría facilitar la continua y masiva migración leucocitaria en la mucosa afectada favoreciendo y manteniendo la inflamación.

2.1. FACTORES ANGIOGÉNICOS

La clave en el proceso de angiogénesis reside en las CE, en los pericitos y en aquellos mediadores que influyen en las actividades biológicas de estas células²⁸. La formación y el crecimiento de los vasos es un fenómeno estrictamente regulado en el cual intervienen distintas células indiferenciadas (por ejemplo, precursores endoteliales provenientes de la médula ósea) o especializadas (como monocitos, mastocitos, endotelios y otras células) y diferentes moléculas señalizadoras, diluidas en el citoplasma o en la matriz extracelular²⁹. Diferentes ligandos y receptores participan en la señalización intra e intercelular. Los factores de crecimiento son moléculas que regulan la migración, proliferación, diferenciación y crecimiento celular, y están codificados por ciertos protooncogenes. Estas moléculas cumplen su función tanto de forma paracrina como autocrina³⁰. Al ser activados, los receptores específicos para estos factores de crecimiento generan una cascada intracelular de transducción de señales en la que participan otras moléculas llamadas segundos mensajeros. Generalmente el paso final es la activación de factores de transcripción, proteínas efectoras nucleares que regulan la transcripción y traducción de genes específicos.

Existen diversos factores de crecimiento que están involucrados en el proceso angiogénico, ya sea estimulándolo o inhibiéndolo. Además, estos factores pueden actuar de manera sinérgica o cooperativa para inducir la formación de nuevos vasos.

Un delicado y dinámico balance entre los péptidos estimuladores e inhibidores mantiene una regulación estricta del complejo proceso angiogénico¹⁹. Los factores de crecimiento son también importantes mediadores que intervienen

en los procesos de inflamación, cicatrización y remodelamiento tisular. Más aún, los resultados de estudios recientes sugieren que el proceso angiogénico depende necesariamente de la presencia de células inflamatorias^{20, 31}. A pesar de que el proceso angiogénico está altamente regulado, aparentemente sólo el aumento de la concentración de un factor de crecimiento sería suficiente para activar toda la cascada de eventos necesarios para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (*figura 1*).

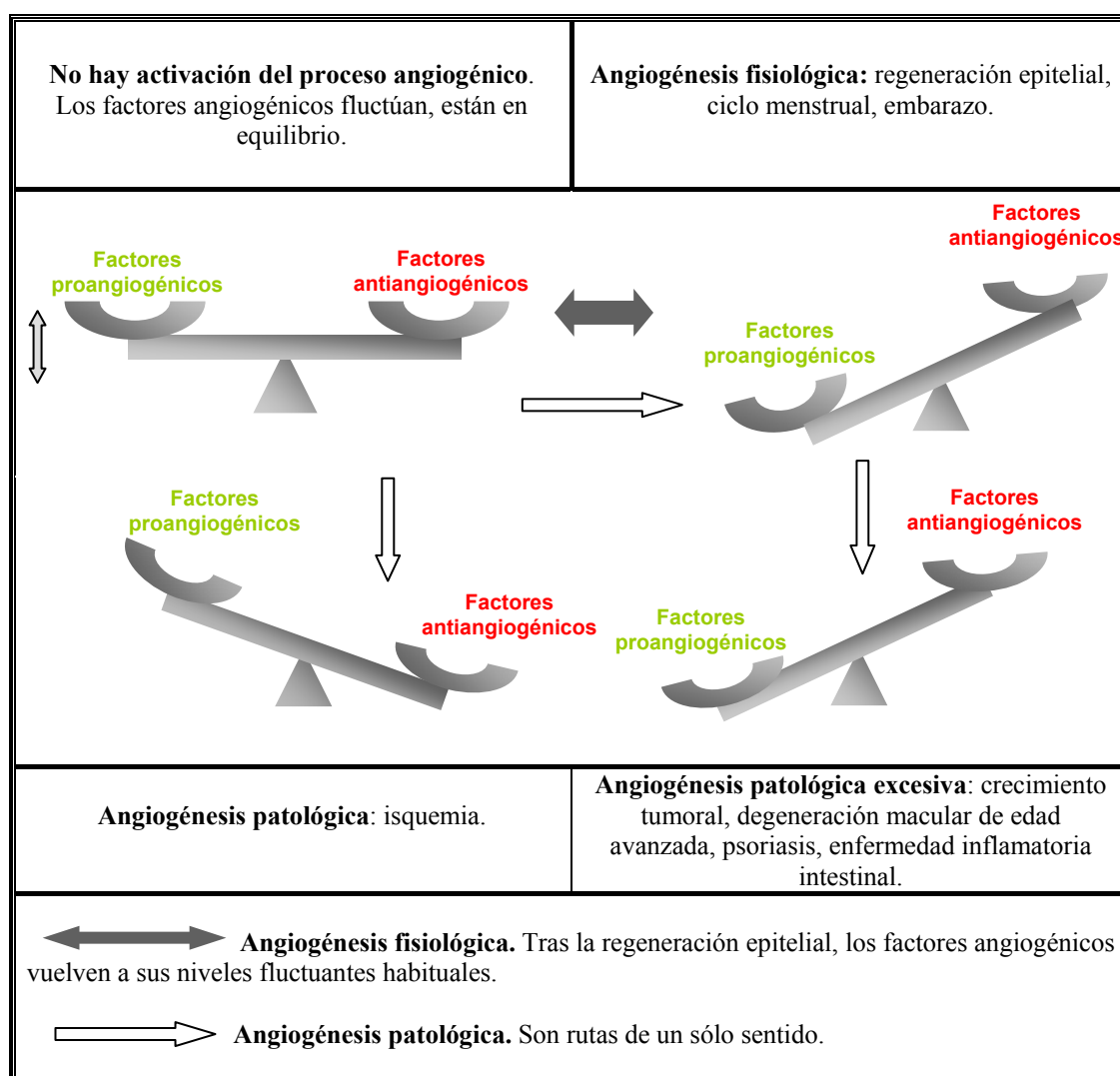


Figura 1. Posibles diferencias en la activación y desarrollo de una angiogenesis fisiológica o patológica.

2.1.1. FAMILIA GÉNICA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

Entre los mediadores que actúan sobre las CE se encuentran los miembros de la familia génica de VEGF/PlGF. De ahí que en estos últimos años gran parte de los trabajos de investigación se hayan centrado en el estudio de estos mitógenos y de sus receptores.

Hasta la fecha, en mamíferos han sido identificados 5 miembros de la familia génica de los factores de crecimiento del endotelio vascular y placentario (VEGF/PlGF) relacionados estructuralmente y con funciones similares: VEGF-A (léase VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF (*Tabla 3*). Estos factores de crecimiento juegan papeles críticos en la regulación fisiológica y patológica de la vasculogénesis, hematopoiesis, angiogénesis, linfangiogénesis y permeabilidad vascular, entre otros^{32, 33}. Adicionalmente, este grupo de proteínas comparten una estructura similar con entrecruzamientos intermoleculares e intramoleculares por puentes disulfuro para dar lugar a una estructura en lazo inconfundible³⁴.

Genes	Localización cromosómica	Isoformas	Unión Receptor	Dímeros formados
VEGF-A	6p23.1	121, 145, 148, 165, 183, 189, 206	VEGFR1 VEGFR-2	VEGF/VEGF VEGF/PlGF VEGF/VEGF-B
VEGF-B	11q13.1	167, 186	VEGFR1	VEGF-B/VEGF-B VEGF-B/VEGF
VEGF-C	4q34.3	-	VEGFR-2 VEGFR-3	VEGF-C/VEGF-C
VEGF-D	Xq22.2	-	VEGFR-2 VEGFR-3	VEGF-D/VEGF-D
PlGF	14q24.3	131, 152, 219 (183)	VEGFR1	PlGF/PlGF PlGF/VEGF-A

Tabla 3. Familia de genes de VEGF/PlGF.

Abreviaturas: Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), placentario (PlGF) y receptores de VEGF (VEGFR)

Las proteínas de esta familia se caracterizan por la presencia de 8 cisteínas conservadas en la misma posición. Dos de ellas forman puentes disulfuro intermoleculares, dando lugar a dímeros. Las otras seis cisteínas forman tres puentes disulfuro intramoleculares^{34, 35}.

Estos factores de crecimiento son ligandos de los receptores tipo tirosina cinasa presentes en la superficie de diversos tipos celulares a los cuales se unen con gran afinidad. Hasta el momento se conocen: VEGFR1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR/ flk-1) y VEGFR-3 (flt-4), neuropilinas y los proteoglicanos heparan sulfatos (*Figura 2*).

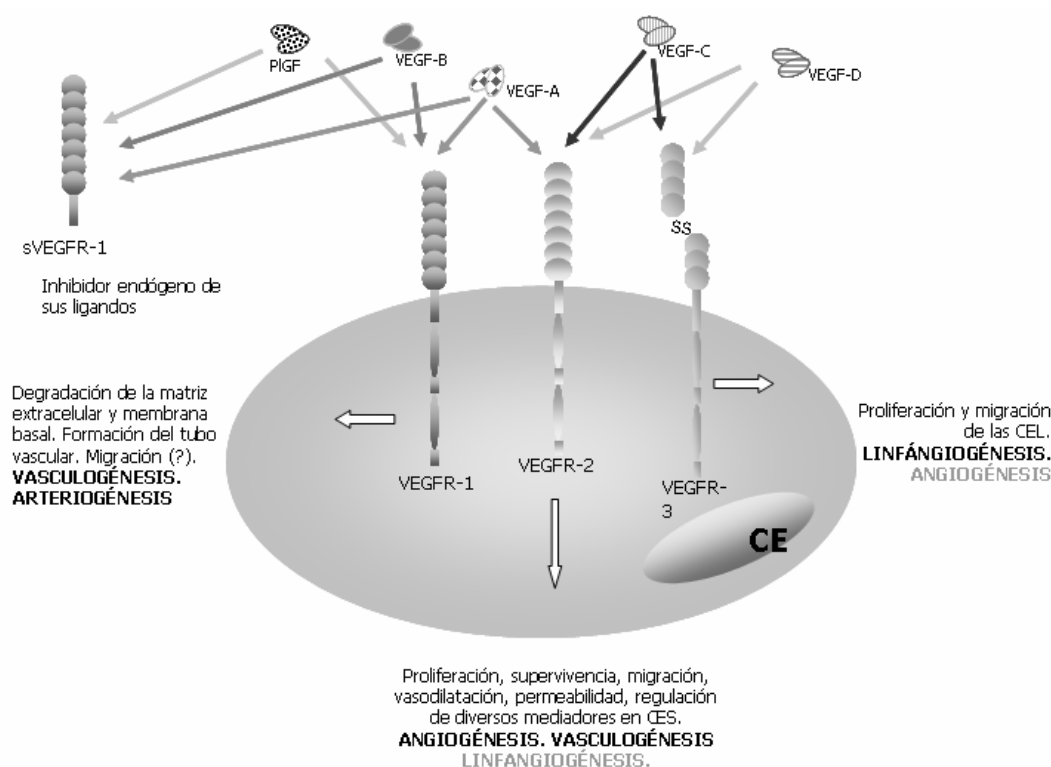


Figura 2. Unión de los miembros de la familia génica del factor de crecimiento del endotelio vascular con sus receptores en las células endoteliales.

Abreviaturas: VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular. sVEGFR1: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-1 soluble. PlGF: factor de crecimiento placentario. CE: Célula Endotelial. CES: CE de los vasos sanguíneos. CEL: CE de los vasos linfáticos.

De los datos provenientes de la literatura podría deducirse que el VEGF está principalmente implicado en el proceso de angiogénesis, y que los otros miembros de la misma familia génica, VEGF-C y VEGF-D, están más relacionados con la linfangiogénesis^{36, 37}, aunque no exclusivamente.

2.1.1.1. VEGF

El VEGF es una glucoproteína dimérica de 34 a 46 kDa, mitogénica y de acción prácticamente exclusiva sobre las CE, las cuales expresan los receptores específicos VEGFR1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR/ flk-1) y VEGFR-3 (flt-4).

Anteriormente este péptido era conocido como vasculotropina o factor de permeabilidad vascular (VPF, del inglés *Vascular Permeability Factor*) debido a su propiedad de inducir aumento de la permeabilidad de los lechos capilares.

El VEGF puede encontrarse en diferentes isoformas que se denominan según el número total de aminoácidos de la cadena polipeptídica^{32, 35}: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. (*Figura 3*). Todas estas moléculas se sintetizan a partir de un gen único, mediante un proceso de *splicing* alternativo posttranscripcional (maduración del transcripto primario, antes llamado ARNhn o ácido ribonucleico heterogéneo nuclear), que genera cadenas de distinto tamaño aminoacídico.

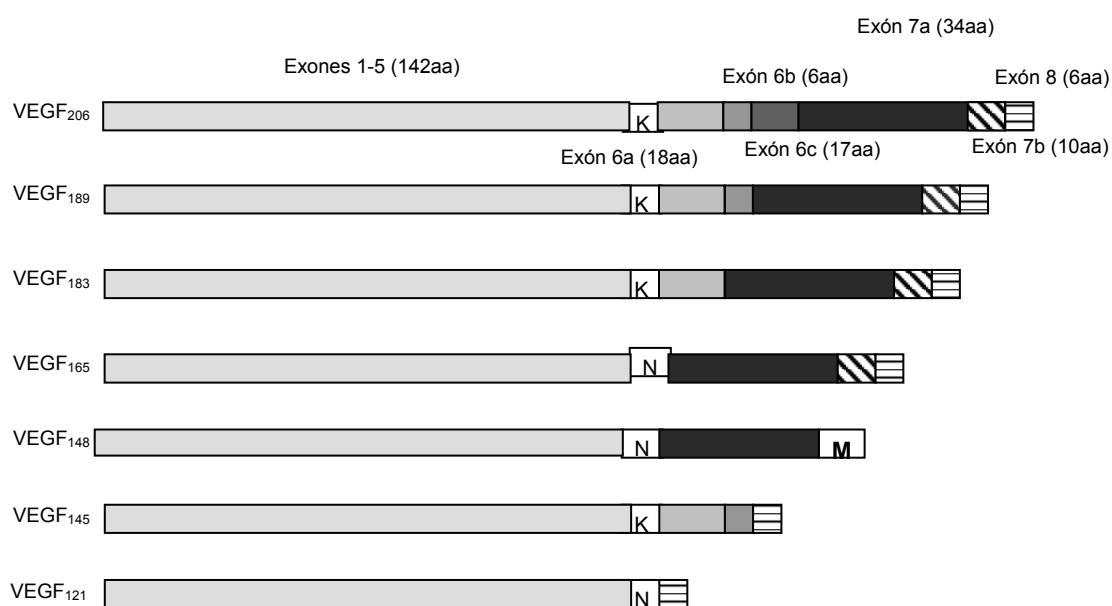


Figura 3. Isoformas del gen VEGF-A.
Abreviaturas: Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF); aminoácido (aa)

Estas isoformas son secretadas en forma de dímeros unidos covalentemente, y cada una de ellas tiene distintas propiedades bioquímicas dependiendo, en gran parte, de su capacidad de unión a la heparina³². Las CE representan la diana preferencial del VEGF, que mediante la unión con sus receptores de membrana tipo tirosina cinasa³⁵, VEGFR1 (o Flt-1) y VEGFR2 (o Flk-1) y sus correceptores, la integrina $\alpha V\beta 5$, la neuropilina 1 y la VE-cadherina, desencadena una transducción de señales que da lugar a sus numerosos y variados efectos biológicos^{32, 38}.

El VEGF estimula la proliferación y migración de las CE y su organización tubular e inhibe la apoptosis de esta célula. Además, esta glucoproteína regula la permeabilidad vascular, favoreciendo la extravasación de proteínas y permitiendo así la formación de un gel de fibrina apto para la migración y organización de las CE. Estimula también la expresión y liberación

de diferentes enzimas proteolíticas necesarias para la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular la cual, al ser degradada, va dejando el espacio necesario para ser ocupado por los nuevos vasos²². Así, entre las funciones biológicas desarrolladas por VEGF se encuentran las siguientes:

- Supervivencia y anti-apoptosis. Un mecanismo importante mediante el cual VEGF promueve la supervivencia de las CE es la activación de la vía antiapoptótica fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)/Akt ^{39, 40}. La activación de esta vía causa la inhibición de la apoptosis a través de su interacción con Bad, caspasa 9, factores de transcripción pertenecientes a la familia Forkhead y reguladores de NFκB (*Nuclear Factor κB*). Aparte, el VEGF induce la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y A1⁴¹, e incrementa la expresión de survivina y XIAP (*x-chromosome linked Inhibitor of Apoptosis*), cuya acción es inhibir la activación de diferentes caspasas ⁴².
- Proliferación. El VEGF tras la interacción con sus receptores induce la proliferación de las CE vía ERK (*Extracellular signal Regulated Kinases*) y de JNK (*c-Jun N-terminal protein Kinase*) y probablemente la respuesta mitogénica al VEGF implique la interacción de estas dos vías de señalización. Esta proliferación permite la formación del endotelio vascular de nuevos vasos en el proceso angiogénico. Parece que VEGFR-2 media la señal de proliferación de CE mediante la ruta PLCγ-PKC-MAPK pero no de la ruta dependiente de Ras⁴³.

- Migración. VEGF es un potente agente quimiotáctico para CE. Uno de los mecanismos responsables a través del cual el VEGF desencadena efectos migratorios en las CE es mediante la activación de la vía PI3K/Akt. La activación de esta vía por el complejo VEGF-VEGFR induce la reorganización de los filamentos de actina dando lugar a fibras de estrés y lamelipodios, que son estructuras necesarias para el proceso de migración⁴⁴. La activación de esta vía también estimula la producción de óxido nítrico mediante fosforilación de la Ser1179 de la sintasa de óxido nítrico endotelial por Akt. El óxido nítrico regula la fosforilación de FAK (*Focal Adhesion Kinase*) y la integridad de las adhesiones focales de las CE, por lo que la producción de óxido nítrico estaría indirectamente implicada en la migración celular inducida por VEGF. En la angiogénesis, la migración de las CE es primordial para que pueda llevarse a cabo.
- Regulación génica y expresión de proteínas y otros factores. El VEGF regula la expresión de diferentes genes en las CE. Se ha demostrado que este factor activa varios factores de transcripción, como Ets-1, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) y Stat 3 y 5 (*Signal transducers and activators of transcription*). El VEGF induce la expresión de los activadores del plasminógeno de tipo tisular y urocinasa, del activador del plasminógeno de tipo 1 y de metaloproteinasas de la matriz extracelular degradadoras de la matriz extracelular. Además, aumenta la expresión de VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) e ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) y la síntesis de PGI₂ (prostaciclina).

- Permeabilidad. El VEGF fue originalmente descrito como factor de permeabilidad, ya que aumenta la permeabilidad del endotelio a través de la formación de espacios intercelulares, orgánulos vesico-vasculares, vacuolas y fenestraciones que podrían facilitar la extravasación de células inflamatorias en condiciones patogénicas⁴⁵, de modo que la permeabilidad es, en parte, controlada por las moléculas implicadas en la formación de estas uniones. El efecto permeabilizante del VEGF está implicado en la formación de ascitis o edema que tiene lugar en diversas patologías. Éstas incluyen el infarto de miocardio, el infarto cerebral, la aterosclerosis, diferentes tipos de cáncer, la diabetes y la psoriasis.
- Vasodilatación. El VEGF lleva a cabo este efecto, a través de la inducción de la sintasa de óxido nítrico endotelial y el consiguiente incremento de la producción de óxido nítrico. De esta manera el endotelio vascular pasaría a ser más débil, de modo que un pequeño roce provocaría el sangrado típico de la mucosa colónica afectada en la enfermedad inflamatoria intestinal.

La expresión de gen VEGF parece estar regulada por estímulos como la hipoxia, factores de crecimiento, mutaciones de p53, estrógenos, TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone*), promotores de genes tumorales, óxido nítrico y por distintas citocinas según el tejido.

La hipoxia (disminución de la tensión de oxígeno) parece ser el principal regulador de la expresión de VEGF tanto *in vitro* como *in vivo*^{32, 46}. El significado fisiológico de la inducción de la expresión de VEGF en respuesta a la hipoxia sería mejorar el aporte de oxígeno a zonas en las que la perfusión tisular ha sido

interrumpida por algún motivo. La hipoxia induce la expresión de VEGF, ya sea por vía transcripcional gracias al factor inducible por hipoxia (HIF-1) o bien posttranscripcional mediante la estabilización del mRNA, ya que éste sufre una rápida degradación debido a la unión de una proteína rica en AU⁴⁷.

Los niveles de HIF-1 aumentan exponencialmente cuando disminuye la concentración de oxígeno a nivel tisular. HIF-1 es el principal responsable de la respuesta celular, local y sistémica a la hipoxia, y se encuentra prácticamente en todos los tejidos humanos. Es un heterodímero compuesto por una subunidad de 120 kDa, HIF-1 α y otra subunidad de 91-94 kDa llamada HIF-1 β o ARNT (*Aryl hydrocarbon Nuclear Translocator*). Esta última se expresa de manera constitutiva en las células de mamíferos, además puede dimerizar con otras proteínas de su misma familia, que tienen una gran capacidad de unión a DNA. En cambio HIF-1 α está finamente regulado por la concentración de oxígeno.

En condiciones de normoxia esta subunidad es casi indetectable, a pesar de que, tanto el gen como la proteína, se expresan de forma constitutiva. Esto es debido a que en condiciones normales de oxígeno, se hidroxilan 2 residuos (Asn803, Pro564). La hidroxilación de la Pro564 permite el reconocimiento por parte de la proteína VHL (*Von Hippel-Lindau*) que facilita la ubiquitinación de HIF-1 α y su posterior degradación por el proteasoma^{47, 48}. En cambio la hidroxilación de Asn803 aunque permite la translocación de esta subunidad al núcleo y su unión con HIF-1 β , impide la unión de CBP (*c Binding Protein*) esencial para la transactivación.

En condiciones de hipoxia HIF-1 α parece estabilizarse y translocarse al núcleo. Ya dentro del núcleo HIF β coopera con la otra subunidad con el fin de activar el gen de VEGF por medio de un motivo específico HRE (*Hypoxia*

Response Element), que es un potenciador situado “upstream” del gen. Para poder activar la transcripción del VEGF, la secuencia consenso no debe estar metilada, HIF-1 debe unirse a varios factores de transcripción con el fin de formar un complejo transcripcional totalmente funcional⁴⁸.

2.1.1.2. FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO (PIGF)

Este factor de crecimiento pertenece a la familia del VEGF, y fue identificado por primera vez en la placenta, aunque se sabe que también está presente en corazón y pulmones. Se expresa en trofoblastos y durante la cicatrización⁴⁹. Se ha descrito que participa activamente en la angiogénesis en diversas patologías neoplásicas⁵⁰⁻⁵⁴.

Existen 4 isoformas identificadas, que se diferencian en su afinidad a la heparina. De estas isoformas, la más estudiada es la PIGF2, que se une con gran afinidad al VEGFR1, induciendo la diferenciación, proliferación y migración de las CE, que son su principal diana⁵⁵.

El PIGF tiene efectos directos sobre las CE, ya que induce la propia señalización celular y amplifica la angiogénesis inducida por VEGF⁵⁶.

PIGF es además un quimiotáctico potente sobre los monocitos, induciendo la acumulación de macrófagos^{57, 58}. Por su parte, esta infiltración de macrófagos podría contribuir a la sobreexpresión de VEGF⁵⁹. También se ha propuesto un papel del PIGF en el proceso de arteriogénesis⁵⁸.

2.2.1.3. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGFR1)

También conocido como Flt-1, es un miembro de la familia de receptores tipo tirosin cinasa. Fue el primer receptor de VEGF-A identificado y se encuentra localizado en el cromosoma 13q12. Se ha sugerido que VEGFR1 tiene un papel crítico en las etapas tardías del desarrollo embrionario en la diferenciación y mantenimiento de los vasos sanguíneos⁶⁰.

No sólo une VEGF-A sino que también une VEGF-B y PlGF (*figura 2*). A pesar de que VEGFR1 tiene una gran afinidad por VEGF, muestra una débil fosforilación del dominio tirosín, tras su unión con el ligando⁶¹.

Aunque VEGFR1 está sobre todo expresado en CE, también se expresa en osteoblastos, monocitos/macrófagos, pericitos, trofoblastos de la placenta, células mesangiales renales e incluso en algunas células *stem* (precursoras) hepatopoyéticas⁶¹. De modo que el VEGFR1 es el único receptor de VEGF que se encuentra en otros tipos celulares distintos a las CE. En monocitos parece mediar la quimiotaxis y migración en respuesta a VEGF⁶². Por otro lado, en las células dendríticas, el VEGF secretado por células tumorales puede inhibir la maduración fisiológica tras su unión con VEGFR1⁶³.

Existe una forma soluble que es el resultado de un *splicing* alternativo del gen, sVEGFR1. Consiste en la parte extracelular de VEGFR1 (menos el séptimo dominio tipo inmunoglobulina) y su función está aún por dilucidar⁶¹. sVEGFR1 podría actuar de diversas maneras: (1) sVEGFR1 participa en la regulación de la biodisponibilidad de VEGF interaccionando con su ligando; (2) a través de la formación de heterodímeros con las formas transmembranales de VEGFR1 y

VEGFR2, sVEGFR1 podría anular la transducción de señales desencadenada tras la activación por la unión del VEGF con estos receptores de superficie⁶¹.

En estudios desarrollados con animales se demostró que VEGFR1 juega un papel crítico en el proceso angiogénico⁶⁴. En un principio se propuso que este receptor sólo transducía señales mitogénicas débiles en las CE y que era un regulador negativo de la acción de VEGF-A en las CE ya que prevenía la unión de VEGF-A/VEGFR-2^{32,65}. En posteriores trabajos se ha observado que VEGFR1 puede heterodimerizar con VEGFR-2, dando lugar a un complejo con mayores efectos sobre estas células que los homodímeros de VEGFR1 y VEGFR2. Asimismo, la activación de VEGFR1 tras la unión de PlGF puede promover la angiogénesis, presumiblemente debido a una comunicación intracelular con VEGFR2.

Durante la angiogénesis y tras un estímulo de hipoxia se produce una sobreexpresión de VEGFR1, lo que indica su papel crítico en estos procesos biológicos⁴⁷. Diversos trabajos proponen que la transducción de señales activadas via VEGFR1 en leucocitos, particularmente en monocitos/macrófagos, es un paso crítico para la amplificación de señales que promueven la hemangiogénesis y linfangiogénesis patológica⁶⁶.

El VEGFR1 se ha asociado con la quimiotaxis de monocitos y el reclutamiento y supervivencia de las células progenitoras derivadas de la médula espinal⁴⁷. La activación del dominio tirosina cinasa del VEGFR1 parece ser un requisito para la migración de monocitos⁶⁷.

Trabajos recientes sugieren que, al menos en determinadas circunstancias, VEGFR1 transduciría señales de supervivencia mediante la inducción del gen antiapoptótico de la survivina⁶⁸.

2.1.2. FAMILIA GÉNICA DE LAS ANGIOPOIETINAS (Ang)

Desde hace años se piensa que la clave en el proceso de neovascularización debían ser las CE y los mediadores que regulaban sus actividades biológicas, aunque han ido adquiriendo gran importancia los pericitos, responsables de la maduración y estabilización de los vasos.

Por ello, el sistema angiopoietina/Tie2 ha concitado recientemente una particular atención porque juega un papel crítico en el proceso angiogénico, sobre todo en la regulación de la estabilización de los vasos sanguíneos recién formados, proceso en el que están implicados los pericitos⁶⁹. Además, parece que Ang1 y Ang2/Tie2 están relacionados en la patogénesis de varios tipos de cáncer⁷⁰

Cuatro angiopoietinas han sido identificadas, Ang1, Ang2, Ang3 y Ang4; todas ellas ligandos capaces de unirse al receptor tipo tirosin cinasa, Tie2 (*Tyrosine kinase with Immunoglobulin and Epidermal growth factor homology domains 2*)⁷¹. De estas pequeñas glucoproteínas, las más estudiadas han sido Ang1 y Ang2⁷².

2.1.2.1. ANGIOPOIETINA 1

La angiopoietina 1 (Ang1) fue el primer ligando conocido para el receptor Tie2 y se expresa de forma constitutiva por varios tipos celulares: pericitos, fibroblastos y algunas células tumorales^{73, 74}.

Esta proteína es crucial en la formación del entramado vascular durante la angiogénesis en el desarrollo del embrión⁷⁵. La Ang1 promueve la angiogénesis y

la supervivencia de las CE, recluta pericitos y se encarga de la estabilización de los vasos sanguíneos^{70, 76}. A pesar de ser un mitógeno débil de endotelios, induce potentemente la formación de brotes endoteliales a través de la secreción de plasmina y de la activación de cinasas de adhesión focal. Actúa sinérgicamente con el VEGF para inducir la angiogénesis y juega un papel crucial al mediar las interacciones recíprocas entre el endotelio y la matriz extracelular o mesénquima circundante.

En contraste con la Ang2, es un factor quimiotáctico para los endotelios⁷⁷. Además, se considera que promueve la maduración de la red vascular neoformada tras el estímulo con VEGF, aumentando el tamaño del lumen vascular y reclutando células periendoteliales⁷⁸.

2.2.2.2. ANGIOPOIETINA 2

La Ang2 es mayoritariamente producida por CE y pericitos. Parece estar expresada en lugares de remodelación vascular, promoviendo la desestabilización de los vasos⁷⁷.

Dependiendo del contexto, esta glucoproteína puede ejercer una acción proangiogénica o antiangiogénica. De ahí, que en diversos estudios *in vivo* se hayan observado diferentes acciones de este factor de supervivencia. En algunos trabajos se ha observado un aumento de la actividad angiogénica y proliferación provocado por la sobreexpresión de Ang2⁷⁹, y en otros, sin embargo, inducía la regresión de los vasos recién formados y la activación del proceso apoptótico⁸⁰. A pesar de estas discrepancias, que deben de ser debidas a las interacciones de la

Ang2 con otros factores angiogénicos, en general se acepta que la sobreexpresión de la Ang2 desestabiliza la vasculatura⁸¹.

La Ang2 no es necesaria para un desarrollo vascular embrionario adecuado, sin embargo juega un papel crucial en la remodelación vascular postnatal⁸². Se ha sugerido que la Ang2 podría colaborar con el VEGF en el frente de invasión de los brotes vasculares al bloquear la estabilización constitutiva o la función de maduración promovida por la presencia de Ang1, permitiendo que los vasos cambien de fenotipo y mantengan un estado más "plástico". En este estado los vasos responderían más a las señales inducidas por el VEGF^{83, 84}.

También se le atribuye a la Ang2 una función de "desestabilización" de las CE quiescentes, antes de su proliferación. Esta molécula actuaría como una señal angiogénica de iniciación, "abriendo" la estructura vascular para permitir la degradación de la membrana basal por parte de las proteasas y facilitando así la acción de inductores angiogénicos como el VEGF.

2.2.2.3. RECEPTOR DE LAS ANGIOPOIETINAS, TIE2

Tie2 es un receptor tipo tirosin cinasa con un dominio de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular tirosin cinasa⁸⁵. El receptor Tie2 está casi exclusivamente expresado en CE y células precursoras hemotopoyéticas⁷⁷. La expresión de este receptor está estimulada en condiciones de hipoxia y por citocinas inflamatorias en CE humanas⁷⁷. Y también podría detectarse en un subconjunto de tumores asociados con monocitos y eosinófilos⁷⁰.

Ang1 y Ang2 se unen a Tie2 con una afinidad igual, pero desencadenan acciones totalmente distintas debido a diferencias en la actividad de unión. Tie2 se

expresa tanto en áreas en las que hay formación de vasos como en áreas donde la vasculatura permanece quiescente, sugiriendo una acción dual de este receptor tanto en el proceso angiogénico como en la estabilización vascular⁷⁷.

En ratones se ha observado que la disfunción de Tie2 es letal en el embrión debido a defectos en la microvasculatura, caracterizados por una reducción del número de CE y un defecto en la morfogénesis vascular⁸⁶. Por ello, se ha sugerido que este receptor tiene un papel fundamental en la maduración y mantenimiento de la estructura vascular tras la unión de las angiopoietinas⁸⁵.

3. ANGIOGÉNESIS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

El desarrollo angiogénico es un proceso claramente dinámico, que requiere múltiples etapas o mecanismos biológicos intercomunicados entre sí para que se lleve a cabo^{28, 87-89} (figura 4).

En los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal se observan concentraciones proteicas y expresiones génicas de citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión anormales en comparación con controles sanos^{89, 90}. Esto podría indicar un proceso angiogénico activo de forma permanente en estos pacientes, lo que favorecería la inflamación característica de estos trastornos.

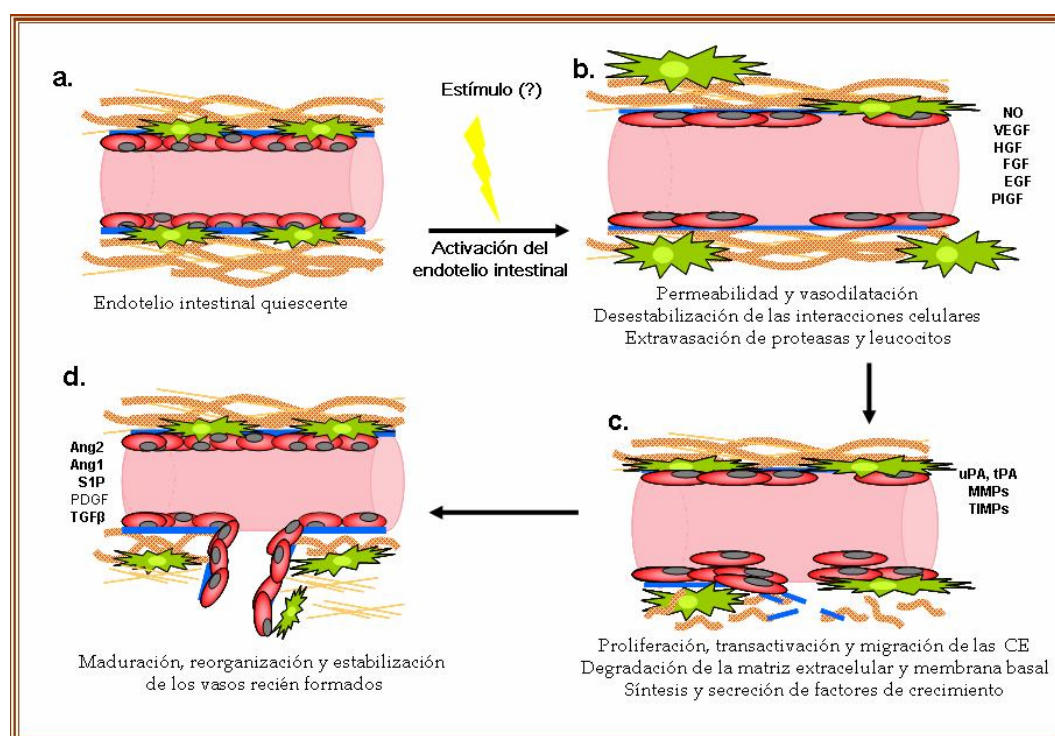


Figura 4. Etapas del proceso angiogénico

Abreviaturas: óxido nítrico (NO), factores de crecimiento: del endotelio vascular (VEGF), hepatocitario (HGF), fibroblástico (FGF), epidérmico (EGF), placentario (PlGF), derivado de plaquetas (PDGF), tumoral beta (TGF-β). Angiopietinas (Ang), metaloproteinasas (MMPs) e inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP), activadores del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y tisular (tPA), esfingosina 1 fosfato (S1P).

3.1. ACTIVACIÓN DEL PROCESO ANGIOGÉNICO.

En el adulto y en condiciones normales las CE permanecen quiescentes, con una vida media prolongada; esta quiescencia está regulada por un equilibrio en el espacio y en el tiempo de múltiples señales. En determinadas situaciones fisiológicas, como es la reparación de los tejidos o el ciclo menstrual, varía el microambiente que rodea las CE, de modo que el equilibrio se ve alterado y las CE se activan.

Varios estudios sugieren que la principal señal iniciadora del proceso de formación de nuevos vasos es el descenso de la presión tisular de oxígeno (hipoxia), que desencadena un aumento del factor de transcripción HIF-1⁹¹. Este factor, a su vez, promueve la expresión de varios tipos de genes relacionados con activadores angiogénicos (activación del proceso angiogénico con el objetivo de restaurar una adecuada presión de oxígeno), con el metabolismo glucídico (puesta en marcha de enzimas necesarias en la glucólisis anaerobia) y de genes relacionados con la supervivencia celular, con aumento de la expresión de p21, disminución de bcl-2 y estabilización de p53 (detención del ciclo celular e inducción de apoptosis si la hipoxia se prolonga).

En pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal se ha observado un aumento en la expresión de los factores inducibles por hipoxia^{92, 93}. Adicionalmente, se han observado alteraciones en la expresión de genes promovidas tras la activación de los factores inducibles por hipoxia, como es el caso de VEGF y PlGF, entre otros.

Debido a su función pleiotrópica y su implicación en la mayoría de las etapas del proceso angiogénico, VEGF ha sido el factor angiogénico más estudiado en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal^{94, 95}. En general se ha observado un aumento de la expresión de VEGF tanto a nivel de mRNA como de proteína en la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, así como un aumento de la concentración circulante de este factor de crecimiento en comparación con controles sanos⁹⁶⁻⁹⁹. Dicho aumento de VEGF en la mucosa intestinal y circulante se correlaciona con la actividad de la enfermedad¹⁰⁰. Sin embargo no todos los autores están de acuerdo con estos hallazgos^{101, 102}.

La sobreexpresión de VEGF en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal no parece guardar relación con ningún polimorfismo del gen¹⁰³. No obstante tal expresión de VEGF se ve modificada con la administración de glucocorticoides, infliximab y talidomida, reduciéndose en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal con el uso de estos fármacos^{94, 104}.

La acción del óxido nítrico y del VEGF produciría una dilatación local de la microvasculatura intestinal, incrementando la permeabilidad vascular y facilitándose la extravasación de mediadores proinflamatorios y angiogénicos. Finalmente, habría una gran variedad de proteínas activas y sobre o infraexpresadas que favorecerían la pérdida del equilibrio fluctuante entre factores pro y antiangiogénicos. De esta manera, las CE de la microvasculatura intestinal perderían su quiescencia, lo que contribuiría a la alteración del equilibrio entre los factores pro y antiangiogénicos, mediante la síntesis y secreción de citocinas y factores de crecimiento.

3.2. CAMBIOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR Y DEGRADACIÓN DE LA MEMBRANA BASAL DE LA MICROVASCULATURA INTESTINAL.

Los vasos se dilatan por efecto del óxido nítrico (sintetizado como resultado de la hipoxia y la acción de los activadores angiogénicos) y aumentan su permeabilidad, lo que permite la extravasación de proteínas plasmáticas, como las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), plasminas, colagenasas y activadores del plasminógeno tanto tisular como tipo urocinasa (tPA y uPA respectivamente), que degradan la matriz extracelular¹⁰⁵. Contrarrestando esta acción, existe una regulación negativa del proceso mediada por los inhibidores tisulares de las MMP¹⁰⁵. Cabe destacar que la matriz extracelular, junto a las moléculas de adhesión, enzimas y otras moléculas intersticiales, como los proteoglicanos, juega un papel crítico en el proceso angiogénico, ya que su degradación es indispensable para dar lugar a los vasos neoformados.

En pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal se ha observado un aumento en la expresión tanto a nivel proteico como de mRNA de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 en comparación con controles sanos¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Por su parte, las MMP-3 y MMP-9 se encuentran sobreexpresadas en las fistulas intestinales, lo que podría contribuir a la formación de fistulas y de su perpetuación mediante la degradación continua de la matriz extracelular¹¹⁰. Además, también la expresión de uPA y de su inhibidor en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal está aumentada cuando se compara con el nivel de estas proteínas en controles sanos¹¹¹.

3.3. PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN Y ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES.

Tras la degradación de la matriz extracelular se crea un espacio para nuevas migraciones de CE, que a su llegada secretarán más factores de crecimiento^{38, 112}. Los endotelioцитos que, como se ha mencionado previamente, en condiciones normales son células quiescentes con vida media prolongada, se encuentran en un nuevo microambiente con altas concentraciones de factores de crecimiento estimuladores y citocinas liberadas por los monocitos/macrófagos y otras células (inflamatorias y no inflamatorias). De modo que se activan y entran en la fase S del ciclo celular.

Se origina así una retroalimentación positiva, produciéndose la diferenciación, migración, invasión y proliferación de las CE. Estas CE, además, desarrollan cambios en su citoesqueleto y en la expresión de moléculas de superficie, como las integrinas, que median la adhesión de la célula al sustrato y la transmisión de señales desde el medio al interior, y moléculas de adhesión, que hacen posible las uniones intercelulares.

Entre otros, el VEGF, PlGF, factor de crecimiento fibroblástico, hepatocitario y la angiogenina son liberados de la matriz extracelular tras la acción de las MMP y del sistema uPA/plasmina. A través de la unión con sus respectivos receptores tipo tirosin-cinasa, estos factores de crecimiento contribuyen de una forma paracrina o autocrina a la proliferación de las CE. En pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal se han observado unos niveles circulantes y locales (en la mucosa intestinal) de VEGF, PlGF, factor de crecimiento fibroblástico, hepatocitario y la angiogenina superiores que en los

observados en controles sanos¹¹³⁻¹¹⁶. Así, podría asumirse que el balance entre la división celular y apoptosis se decanta por la proliferación de las CE intestinales, lo que reflejaría una proliferación activa de estas células.

A su vez, las MMP continúan degradando la membrana basal junto a otras proteínas tipo cadherinas, integrinas y selectinas facilitando la migración y adhesión de las nuevas células para establecer las interacciones intercelulares^{38, 112}. Como los factores de crecimiento nombrados anteriormente, muchas moléculas de adhesión se sobreexpresan en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, como es el caso de la integrina $\alpha 4$ ¹⁰¹ (que ha sido propuesta como diana terapéutica en pacientes con EC^{117, 118}) o la fractalcina¹¹⁹; ambas relacionadas no sólo con el proceso angiogénico sino con la inflamación.

3.4. REMODELACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LA NUEVA MICROVASCULATURA INTESTINAL.

Tras la acción conjunta de factores de crecimiento y moléculas de adhesión, las nuevas CE se ordenan formando cordones sólidos y, posteriormente, se tunelizan, aumentando su diámetro y se ramifican¹²⁰. Progresivamente se resintetiza tanto la membrana basal como la matriz extracelular contigua, y los pericitos se reorganizan y pasan a formar parte de la túnica media de los vasos de pequeño calibre (capilares y pequeñas vénulas), restableciendo el contacto intercelular¹²¹. Estas células periendoteliales sintetizan péptidos vasoactivos, factores de crecimiento, citocinas y la matriz extracelular, que sirven de estructura de soporte, a través de la cual los vasos migran, almacenan y movilizan factores de crecimiento¹²¹. La llegada de estas células periendoteliales está mediada por

diversos factores de crecimiento y de supervivencia, que intervienen en la interacción pericito-CE, favoreciendo que los vasos adquieran una conformación madura y estable.

En esta etapa del proceso angiogénico, la acción de las angiopoietinas (Ang1, Ang2) y de su receptor común tipo tirosin cinasa, Tie2 parecen ser cruciales. Esta acción se ve influida por la presencia o la ausencia del VEGF, que parece decisiva para la formación o regresión de la nueva estructura endotelial¹²². Finalmente, a medida que la circulación se restablece, los nuevos vasos formados se alargan de manera progresiva. Los procesos de maduración y remodelado intervienen en la formación de la estructura tubular final. En los vasos sanguíneos con dimensiones mayores que los capilares se suma la participación de las células del músculo liso vascular (miocitos lisos que responden a los péptidos activos liberados por otras células e inclusive por ellos mismos), quienes también migran y se adhieren a la nueva (resintetizada) matriz extracelular de los neovasos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El mantenimiento de la respuesta inflamatoria característica de la EC podría estar ligado a una regulación anómala del proceso angiogénico fisiológico. El estudio de los niveles circulantes de VEGF y otros factores angiogénicos en pacientes con EC en remisión permitiría discernir si las posibles alteraciones de las concentraciones séricas de estos mediadores angiogénicos se deben al componente inflamatorio agudo de la enfermedad o se expresan incluso cuando la enfermedad está silente. Un desequilibrio sistémico de la homeostasis microvascular podría ser consecuencia de una alteración estructural y funcional de la microvasculatura intestinal que facilitaría la continua y masiva migración leucocitaria en la mucosa afectada, favoreciendo y manteniendo la inflamación.

El encontrar diferencias en las concentraciones de los factores solubles angiogénicos entre los distintos patrones evolutivos de la enfermedad (inflamatorio, estenosante o fistulizante) podría ayudar a predecir la evolución de estos pacientes, y así poder seleccionar precozmente el tratamiento más adecuado.

1. OBJETIVOS PRIMARIOS

1. Analizar las concentraciones séricas de VEGF, PlGF, VEGFR1, Ang1, Ang2 y Tie2 en pacientes con EC en remisión y en controles sanos.

2. Comparar las concentraciones séricas de VEGF, PlGF, VEGFR1, Ang1, Ang2 y Tie2 de los pacientes con EC en remisión en función de su patrón fenotípico de la enfermedad (inflamatorio, estenosante y fistulizante).

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Analizar las concentraciones séricas de VEGF, PlGF, VEGFR1, Ang1, Ang2 y Tie2 de los pacientes con EC en remisión clasificados según su edad de diagnóstico y la localización de su enfermedad.
2. Evaluar los niveles de factores solubles angiogénicos según los años de evolución de la enfermedad, el tabaco, el tener antecedentes familiares, el haber sido apendicectomizado y colectomizado, el tener manifestaciones extraintestinales y alergias, y el tratamiento recibido.
3. Correlacionar las concentraciones de reactantes de fase aguda (proteína C reactiva, orosomucoide y fibrinógeno) y tipos celulares circulantes (plaquetas, linfocitos, neutrófilos) con las concentraciones de los factores solubles angiogénicos.

SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS

SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y CONTROLES

Setenta pacientes (56% mujeres; media de edad 43 ± 14 años, rango de edad de 22 a 80 años) con un diagnóstico clínico, analítico, endoscópico y anatomopatológico de EC fueron incluidos en el presente trabajo.

Por otra parte, cuarenta y cuatro voluntarios sanos (52% mujeres; media de edad 47 ± 15 años, rango de edad de 25 a 81 años) fueron incluidos en el estudio y clasificados como controles sanos.

Se obtuvo el consentimiento informado debidamente firmado y fechado por parte de todos los participantes, que tras leer la hoja de información, accedieron a participar en el presente estudio. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario de la Princesa.

Se incluyeron pacientes con EC que no presentaban actividad de la enfermedad desde al menos tres meses previos a su inclusión en el estudio, lo que significa que en el momento en el que se firmó el consentimiento informado el índice de actividad de los pacientes, determinado con el “*Crohn’s Disease Activity Index*” (CDAI), era menor a 150.

Los participantes que recibían como tratamiento de mantenimiento alguna terapia biológica, como infliximab, adalimumab, certolizumab, aquellos que presentaban cáncer, trastornos coronarios, hipertensión maligna o mujeres embarazadas fueron excluidos del estudio. También se excluyeron del estudio los

pacientes que no tuvieran bien definido el diagnóstico de EC, que presentaran actividad de otra patología inflamatoria asociada o no a la enfermedad inflamatoria intestinal, o que hubieran sido operados tres meses previos a la extracción sanguínea para la determinación de las concentraciones de factores solubles angiogénicos.

2. DISEÑO DEL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Estudio de investigación controlado y prospectivo. Los pacientes que acudían a las consultas monográficas de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario de La Princesa para una revisión rutinaria de su enfermedad y cumplían con los criterios de inclusión fueron seleccionados para participar en el presente estudio. Si el CDAI de los pacientes era menor a 150, se les explicaba el estudio y firmaban el consentimiento informado, tras resolver posibles dudas que les pudieran surgir acerca del estudio, y siempre y cuando estuvieran de acuerdo con él. Se respetó en todo momento la autonomía, beneficencia y no maleficencia, voluntariedad y confidencialidad del participante.

Se enfrentaron ambos grupos, pacientes con EC y controles sanos, en proporción 2:1. Sin embargo algunos pacientes fueron descartados ya que no cumplían criterios de inclusión o cumplían criterios de exclusión cuando se revisaron las historias clínicas. De modo que finalmente se analizaron 70 pacientes con EC.

Por otra parte se cumplimentaba un formulario que recogía variables críticas, como el año de diagnóstico, el tiempo que llevaban en remisión, si fumaban, si tenían antecedentes familiares (con enfermedad inflamatoria intestinal), si habían sido apendicectomizados, si habían sido intervenidos quirúrgicamente del colon por empeoramiento de su enfermedad, si presentaban manifestaciones extraintestinales (articulares, cutáneas, otras) y el tratamiento de mantenimiento que recibían. Los pacientes con EC fueron clasificados según la clasificación de Viena en función de la edad de diagnóstico, la localización de la zona afectada y el comportamiento o fenotipo de la enfermedad (inflamatorio, estenosante o fistulizante), así como tipo de fistula (si procediera).

Se extrajeron 5-10 ml de sangre del participante para la obtención de suero en un tubo de gelosa. Dicha extracción sanguínea coincidía con un análisis de sangre realizado por motivos asistenciales (para la revisión rutinaria de su enfermedad), en los que se determinaban las concentraciones séricas de parámetros de laboratorio estándar como conteo plaquetario, linfocitario y de neutrófilos y reactantes de fase aguda. Estos parámetros de laboratorio fueron determinados mediante procedimientos rutinarios en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario de La Princesa.

Una vez obtenida la muestra se depositó en nevera 4°C unos 30 minutos aproximadamente para permitir su coagulación. Después se centrifugó a 2500-3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se repartió en tubos eppendorf que fueron almacenados en una nevera a -80°C hasta la determinación de los factores solubles angiogénicos objeto del estudio.

3. DEFINICIONES

Fumador: participante que fuma más de 5 cigarrillos al día.

Apendicectomizado: aquel participante en el estudio del cual se tiene constancia, ya fuera radiológica o mediante informe de cirugía, de la extirpación del apéndice.

Manifestaciones extraintestinales: pacientes que presentan enfermedades extraintestinales que pueden preceder, acompañar o comportarse de forma independiente de la enfermedad intestinal subyacente. Suelen ser manifestaciones cutáneas, oculares y articulares.

Remisión: pacientes con EC que no tienen sintomatología de la enfermedad, es decir que está silente y el CDAI es < 150 .

Fenotipo de la enfermedad: comportamiento de la enfermedad que se dividen según la clasificación de Viena (tabla 1) en:

B1: no obstructivo no fistulizante (inflamatorio). Las lesiones mucosas iniciales consisten en ulceraciones superficiales de pequeño tamaño (aftas) que progresan a úlceras profundas lineales rodeadas de una mucosa en empedrado. Cursa en forma de brotes de actividad. La resección se indica por fallo del tratamiento médico. Es frecuente la recurrencia quirúrgica.

B2: obstructivo (fibroestenósante). Se caracteriza por la disminución del calibre de la luz intestinal sin evidencia de fistulas y en ausencia de actividad. Suele presentar una evolución indolente con necesidad tardía de cirugía y con baja tasa de recurrencia generalmente también de tipo obstructivo. La sintomatología más frecuente es la presencia de cuadros suboclusivos u oclusivos.

B3: fistulizante. Se asocia con el desarrollo de fistulas intraabdominales o perianales, masas inflamatorias y/o abscesos en el curso de la enfermedad. Es la forma más agresiva, con necesidad precoz de cirugía y rápida recurrencia.

Fístula perianal: conducto anormal, ulcerado y estrecho que afecta a la región perianal.

Fístula interna: engloban las fistulas enterocutáneas, enteroentéricas – ileocecal, ileocólica, ileorectal-, enterovesicales y enterovaginales.

4. DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS

Para medir las concentraciones de VEGF, PlGF, VEGFR1, Ang1, Ang2 y Tie2 se utilizó la técnica de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). Para ello, se empleó un *kit* estandarizado específico para cada proteína a determinar (*Human Immunoassay Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, USA*). Sus concentraciones fueron calculadas a partir de una curva patrón obtenida a partir de los estándares incluidos en el kit, según la ley de Lambert-Beer, Absorbancia_{450nm} = constante + constante x [concentración]. Las constantes se obtienen a partir de la coordenada de origen y pendiente de la curva patrón obtenida.

Las precisiones interensayo e intraensayo fueron determinadas y calculadas, aunque sus valores se asemejaron a las calculadas por el fabricante.

5. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Las variables, tanto cuantitativas como cualitativas, que se recogieron en una base de datos previamente diseñada, fueron las siguientes: sexo, fumador, año de diagnóstico, tiempo en remisión de la enfermedad, antecedentes familiares, edad al diagnóstico, localización y patrón evolutivo de la enfermedad según la clasificación de Viena, si habían sido apendicectomizados u operados de colon por complicaciones de la EC, si tenían alergias, si presentaban manifestaciones extraintestinales y el tratamiento de mantenimiento. Además, se determinaron las concentraciones séricas de los factores solubles angiogénicos (VEGF, PlGF, VEGFR1, Ang1, Ang2 y Tie2), hemograma (cuenta de plaquetas, linfocitos...) y reactantes de fase aguda (proteína C reactiva, orosomucoide y fibrinógeno).

Para las variables cuantitativas se calcularon, como medidas de tendencia central, la media aritmética y como medida de dispersión, la desviación estándar. En estas variables se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov para poner a prueba la hipótesis de normalidad. En las variables cualitativas se describe la distribución de frecuencias (porcentajes) para cada una de las distintas categorías.

Para hacer las comparaciones entre las medias de dos grupos, en las variables cuya distribución fue Normal se utilizó el test de la t de Student para muestras independientes. Para estudiar la relación entre las variables cualitativas se ha empleado el test ji-cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher en aquellos casos en que ha sido necesario. Para el análisis de las concentraciones séricas de los factores angiogénicos según el comportamiento fenotípico de la enfermedad (inflamatorio, estenosante y fistulizante), se utilizó el test de ANOVA con la corrección de Tukey para comparaciones múltiples. La asociación lineal de

la concentración de los factores solubles angiogénicos entre ellos y su relación con los reactantes de fase aguda (proteína C reactiva, orosomucoide y fibrinógeno) y contaje circulante de diversos tipos celulares (plaquetas, neutrófilos y linfocitos) se analizó mediante correlaciones bivariadas y regresión lineal. En todos los casos se consideró como significativo un p-valor inferior o igual a 0,05.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS v15.00 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, EEUU).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

1.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE PACIENTES Y CONTROLES

Se describe la muestra de controles y pacientes con EC en remisión según las siguientes variables:

1.1.1. Edad

	N	Rango	Media	Desviación estándar
Controles	44	25-81	47	15
Pacientes EC	70	22-80	43	14

Tabla 4. Descriptivo de la edad de los pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos.
Abreviaturas: EC (enfermedad de Crohn).

1.1.2. Sexo

		Frecuencia	Porcentaje
Controles	hombre	21	48
	mujer	23	52
Pacientes EC	hombre	31	44
	mujer	39	56

Tabla 5. Frecuencia del sexo de los pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos.

1.1.3. Tabaco

		Frecuencia	Porcentaje
Controles	no	30	68
	si	13	30
	exfumador	1	2
Pacientes EC	no	35	50
	si	27	39
	exfumador	8	11

Tabla 6. Frecuencia del hábito tabáquico de los pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos

1.2. DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE PACIENTES

Se describen variables clínicas y fenotípicas relacionadas con la EC.

1.2.1. Años de evolución

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	<5 años	13	19
	5-10 años	21	30
	>11 años	36	51

Tabla 7. Descriptivo de los años de evolución de la enfermedad estratificado.
Abreviaturas: EC (enfermedad de Crohn).

	N	Rango	Media	Desviación estándar
Pacientes EC	70	1-30	11	7

Tabla 8. Descriptivo de los años de evolución de la enfermedad.

1.2.2. Semanas en remisión

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	12-52 semanas	39	56
	>52 semanas	31	44

Tabla 9. Frecuencia de la muestra según las semanas que llevan en remisión de la enfermedad.

1.2.3. Antecedentes familiares

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	no	40	57
	si	7	10
	No contestan	23	33

Tabla 10. Frecuencia de antecedentes de la enfermedad.

1.2.4. Apendicectomizados

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	no	45	64
	si	14	20
	No contestan	11	16

Tabla 11. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que han sido apendicectomizados.

1.2.5. Colectomizados/Hemicolectomizados

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	no	38	54
	si	32	46

Tabla 12. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que han sido operados del colon.

1.2.6. Manifestaciones extraintestinales

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	no	55	79
	si	15	21

Tabla 13. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que presentan manifestaciones extraintestinales.

Del total de los pacientes el 10% tenían manifestaciones extraintestinales cutáneas y el 11% articulares.

1.2.7. Alergias

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	no	22	31
	si	13	19
	No contestan	35	50

Tabla 14. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que tienen alergia

1.2.8. Clasificación de Viena según edad de diagnóstico

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	17-40 años	54	77
	>40 años	16	23

Tabla 15. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn clasificados según la edad de diagnóstico.

1.2.9. Clasificación de Viena según la localización

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	leon terminal	13	19
	Colon	16	23
	Ileocólica	35	50
	Tracto digestivo alto	6	8

Tabla 16. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn clasificados según la localización de zona afectada.

1.2.10. Clasificación de Viena según en comportamiento fenotípico de la enfermedad

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	Inflamatorio	22	31
	Estenosante	19	27
	Fistulizante	29	42

Tabla 17. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn clasificados según el patrón evolutivo de la enfermedad.

1.2.11. Fístulas

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	no	41	59
	si	29	41

Tabla 18. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn con fístulas.

Los 29 pacientes fistulizantes fueron clasificados según el tipo de fístulas que presentaban, pudiendo ser perianales e internas (que engloban las fístulas enterocutáneas, enteroentéricas –ileocecal, ileocólica, ileorectal-, enterovesicales y enterovaginales).

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	Perianal	17	59
	Interna	12	41

Tabla 19. Frecuencia del tipo de fístulas en pacientes con enfermedad de Crohn.

1.2.12. Tratamiento

Al estar en remisión de su enfermedad, el 23% de los pacientes con EC no recibían tratamiento. Los tratamientos habituales de mantenimiento son los aminosalicilatos (aunque existen datos controvertidos ya que se ha observado un dudoso beneficio frente a placebo), corticoides (pacientes corticodependientes) e inmunomoduladores como azatioprina o 6-mercaptopurina o metotrexato.

		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	no	16	23
	si	54	77

Tabla 20. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que reciben tratamiento.

Aminosalicilatos		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	no	52	74
	si	18	26

Tabla 21. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que reciben tratamiento con aminosalicilatos.

Inmunomoduladores		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	no	29	41
	si	41	59

Tabla 22. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que reciben tratamiento con inmunomoduladores.

Corticoides		Frecuencia	Porcentaje
Pacientes EC	no	66	94
	si	4	6

Tabla 23. Frecuencia de pacientes con enfermedad de Crohn que reciben tratamiento con corticoides.

2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA

2.1. FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS EN PACIENTES CON EC Y CONTROLES.

La distribución de las concentraciones circulantes de los factores angiogénicos de nuestra muestra seguía una distribución Normal. Como se refleja en la *tabla 24*, los pacientes con EC mostraban concentraciones de los factores solubles angiogénicos elevadas en comparación con los controles sanos. Las diferencias eran estadísticamente significativas (VEGF: 489 ± 299 vs. 342 ± 137 pg/ml, $p < 0,001$; PlGF: 31 ± 9 vs. 22 ± 8 pg/ml, $p < 0,001$; VEGFR1: $1,7 \pm 0,5$ vs. $1,0 \pm 0,3$ ng/ml, $p < 0,001$; Ang2: $4,8 \pm 1,9$ vs. $3,5 \pm 1,8$ ng/ml, $p < 0,001$; Tie2: 36 ± 5 vs. 23 ± 7 ng/ml, $p < 0,001$). En el caso de la Ang1, las concentraciones circulantes en pacientes con EC se veían significativamente disminuidas comparados con los controles sanos (40 ± 12 vs. 62 ± 22 ng/ml, $p < 0,001$).

		N	Media	Desviación estándar
VEGF [pg/mL]	Pacientes EC *	70	489	299
	Controles	44	342	137
PlGF [pg/mL]	Pacientes EC *	70	31	9
	Controles	44	22	8
VEGFR1 [ng/mL]	Pacientes EC *	70	1,7	0,5
	Controles	44	1,0	0,3
Ang1 [ng/mL]	Pacientes EC *	70	40	12
	Controles	44	62	22
Ang2 [ng/mL]	Pacientes EC *	70	4,8	1,9
	Controles	44	3,5	1,8
Tie2 [ng/mL]	Pacientes EC *	70	36	5
	Controles	44	23	7

Tabla 24. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos en pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos

Abreviaturas: Enfermedad de Crohn (EC), Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), Factor de crecimiento plaquetario (PlGF), Receptor de VEGF (VEGFR1), Angiopoietinas (Ang1 y Ang2) y Receptor de las angiopoietinas (Tie2). * $p < 0,001$

2.2. FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS SEGÚN EL PATRÓN EVOLUTIVO DE LOS PACIENTES CON EC.

Adicionalmente, las concentraciones de los factores solubles angiogénicos se compararon en función del patrón fenotípico de los pacientes con EC (inflamatorio, estenosante y fistulizante), sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los patrones evolutivos de la enfermedad (*tabla 25*).

		N	Media	Desviación estándar
VEGF [pg/mL].	Inflamatorio	22	444	375
	Estenosante	19	532	270
	Fistulizante	29	495	253
PIGF [pg/mL]	Inflamatorio	22	32	13
	Estenosante	19	33	6
	Fistulizante	29	30	6
VEGFR1 [ng/mL]	Inflamatorio	22	1,6	0,4
	Estenosante	19	1,7	0,5
	Fistulizante	29	1,8	0,5
Ang1 [ng/mL]	Inflamatorio	22	42	13
	Estenosante	19	39	11
	Fistulizante	29	40	12
Ang2 [ng/mL]	Inflamatorio	22	4,5	1,2
	Estenosante	19	5,4	2,6
	Fistulizante	29	4,7	2,0
Tie2 [ng/mL]	Inflamatorio	22	36	6
	Estenosante	19	36	6
	Fistulizante	29	35	4

Tabla 25. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos en pacientes con enfermedad de Crohn clasificados según su patrón fenotípico de la enfermedad.

Recientemente se ha propuesto la clasificación de Montreal¹², ya que tras la aplicación de la clasificación de Viena en la práctica asistencial se consideraron necesarias algunas modificaciones. En relación al patrón evolutivo, en la clasificación propuesta en Montreal se especifica más la existencia de enfermedad perianal, añadiendo un “modificador” (p) al patrón predominante. Esta

diferenciación se adoptó tras constatar que la existencia de fístulas perianales no se asociaba a una mayor frecuencia de complicaciones fistulizantes intraabdominales¹²³. Era importante remarcar que, dado que el patrón de comportamiento varía con elevada frecuencia en los primeros 5-10 años de enfermedad, es aconsejable no definirlo hasta pasados los primeros 5 años desde el diagnóstico¹²⁴.

Dado este hecho los pacientes con EC fueron divididos según los años de evolución de su enfermedad, por si esto pudiera interferir en los resultados. Sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas de los niveles de factores solubles angiogénicos entre los 3 grupos definidos (*tabla 26*)

		N	Media	Desviación estándar
VEGF [pg/mL].	<5años	13	541	463
	5-10 años	21	413	225
	>11 años	36	514	260
PIGF [pg/mL]	<5años	13	30	4
	5-10 años	21	34	13
	>11 años	36	30	6
VEGFR1 [ng/mL]	<5años	13	1,7	0,6
	5-10 años	21	1,7	0,4
	>11 años	36	1,7	0,4
Ang1 [ng/mL]	<5años	13	43	13
	5-10 años	21	42	13
	>11 años	36	38	11
Ang2 [ng/mL]	<5años	13	5,2	2,4
	5-10 años	21	5,2	2,3
	>11 años	36	4,5	1,6
Tie2 [ng/mL]	<5años	13	36	5
	5-10 años	21	37	7
	>11 años	36	35	5

Tabla 26. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos en pacientes con enfermedad de Crohn estratificados según los años de evolución.

También se analizaron las concentraciones de factores solubles angiogénicos dependiendo de si el paciente tenía o no fistulas (*tabla 27*) y del tipo de fistula, diferenciando en perianal o interna (*tabla 28*). Únicamente se observó un aumento significativo de las concentraciones de Tie2 en los pacientes con EC con fistula interna.

		N	Media	Desviación estándar
VEGF [pg/mL].	no	41	485	329
	si	29	495	253
PIGF [pg/mL]	no	41	32	10
	si	29	30	6
VEGFR1 [ng/mL]	no	41	1,7	0,5
	si	29	1,8	0,5
Ang1 [ng/mL]	no	41	40	12
	si	29	40	12
Ang2 [ng/mL]	no	41	4,9	2,0
	si	29	4,7	2,0
Tie2 [ng/mL]	no	41	36	6
	si	29	35	4

Tabla 27. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos según el hecho de tener fistulas.

		N	Media	Desviación estándar
VEGF [pg/mL].	Perianal	17	464	207
	Interna	12	538	311
PIGF [pg/mL]	Perianal	17	31	7
	Interna	12	29	4
VEGFR1 [ng/mL]	Perianal	17	1,7	0,4
	Interna	12	2,0	0,6
Ang1 [ng/mL]	Perianal	17	39	12
	Interna	12	40	12
Ang2 [ng/mL]	Perianal	17	4,4	2,0
	Interna	12	5,1	2,0
Tie2 [ng/mL]	Perianal	17	34	4
	Interna *	12	37	4

Tabla 28. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos según el tipo de fistula.

* p <0,05

2.3. FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS SEGÚN LA EDAD DE DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES CON EC.

Además, los pacientes con EC fueron clasificados según su edad de diagnóstico. La reciente clasificación de Montreal distingue también aquellos pacientes que fueron diagnosticados a los 16 años o antes.

En el presente estudio todos los pacientes se diagnosticaron en el Hospital Universitario de La Princesa, que no atiende a enfermos pediátricos, y por lo tanto superan los 18 años de edad.

Como refleja la *tabla 29*, aunque existen tendencias de aumento de la concentración de VEGF y Ang2 en los pacientes que han sido diagnosticados a una edad superior a 40 años, no hay diferencias estadísticamente significativas.

		N	Media	Desviación estándar
VEGF [pg/mL].	17-40 años	54	460	269
	>40 años	16	588	373
PIGF [pg/mL]	17-40 años	54	31	10
	>40 años	16	33	4
VEGFR1 [ng/mL]	17-40 años	54	1,7	0,4
	>40 años	16	1,8	0,6
Ang1 [ng/mL]	17-40 años	54	40	12
	>40 años	16	42	11
Ang2 [ng/mL]	17-40 años	54	4,7	2,0
	>40 años	16	5,1	2,2
Tie2 [ng/mL]	17-40 años	54	36	6
	>40 años	16	36	5

Tabla 29. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos según la edad de diagnóstico de la enfermedad.

2.4. FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS SEGÚN LA LOCALIZACIÓN DE LA EC.

Asimismo, los pacientes con EC fueron clasificados según los tramos afectados del tubo digestivo. Para considerar la afección de cualquier tramo, la mínima lesión requerida es la lesión aftoide o la úlcera, no siendo suficiente lesiones con el eritema o el edema (*tabla 30*).

		N	Media	Desviación estándar
VEGF [pg/mL].	Íleon terminal	13	525	277
	Colon	16	326	212
	Ileocólica	35	526	283
	Tracto digestivo alto	6	630	491
PIGF [pg/mL]	Íleon terminal	13	31	5
	Colon	16	34	15
	Ileocólica	35	31	6
	Tracto digestivo alto	6	30	5
VEGFR1 [ng/mL]	Íleon terminal	13	1,9	0,5
	Colon	16	1,7	0,4
	Ileocólica	35	1,8	0,5
	Tracto digestivo alto *	6	1,2	0,2
Ang1 [ng/mL]	Íleon terminal	13	43	12
	Colon	16	41	15
	Ileocólica	35	39	11
	Tracto digestivo alto	6	36	11
Ang2 [ng/mL]	Íleon terminal	13	5,6	2,7
	Colon	16	4,8	1,6
	Ileocólica	35	4,8	1,9
	Tracto digestivo alto	6	3,2	0,7
Tie2 [ng/mL]	Íleon terminal	13	37	7
	Colon	16	35	6
	Ileocólica	35	36	5
	Tracto digestivo alto	6	35	4

Tabla 30. Concentraciones de los factores solubles angiogénicos según la localización de la enfermedad.

* $p < 0,05$

Aunque se observan diferencias en los niveles circulantes de los factores angiogénicos, especialmente en las concentraciones de VEGF, VEGFR1 y Ang2, únicamente los niveles de VEGFR1 muestran diferencias estadísticamente significativas entre grupos, observándose una menor concentración de estos niveles séricos en pacientes con EC y afectación del tracto digestivo alto ($p < 0,05$).

2.5. FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS SEGÚN DIVERSAS VARIABLES EN PACIENTES CON EC.

Las concentraciones de los factores solubles angiogénicos también fueron analizadas según diversas variables de interés, reflejándose los siguientes resultados:

- El hecho de que los pacientes con EC fueran fumadores no alteraba los niveles de factores solubles angiogénicos.
- Los pacientes con EC y antecedentes familiares de enfermedad inflamatoria intestinal tenían unos niveles significativamente menores de VEGFR1 ($1,4 \pm 0,4$ vs $1,7 \pm 0,5$ ng/mL; $p < 0,05$) y de Ang2 ($3,2 \pm 0,5$ vs $4,5 \pm 1,6$ ng/mL; $p < 0,001$), respecto a aquellos enfermos que no tenían antecedentes familiares.
- En los pacientes con EC apendicectomizados se observaron concentraciones de PlGF significativamente menores (27 ± 3 vs 33 ± 10 pg/mL; $p < 0,01$).
- El hecho de haber sufrido una colectomía, debido a una complicación de su enfermedad, no parecía alterar las concentraciones de los factores

solubles angiogénicos, es decir, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

- Aquellos pacientes con EC que tenían manifestaciones extraintestinales mostraron niveles significativamente menores de Ang2 frente a aquellos pacientes que no presentaban problemas cutáneos o articulares ($4,0 \pm 0,9$ vs $5,1 \pm 2,1$; $p < 0,01$).
- Las concentraciones de factores solubles angiogénicos no diferían entre los pacientes con EC que tenían algún tipo de alergia.
- Cuando se compararon las concentraciones séricas de los factores angiogénicos entre el grupo de pacientes con EC que seguía un tratamiento de mantenimiento y el que no, se observó que no existían diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos que recibían: aminosalicilatos e inmunomoduladores (azatioprina, 6-mercaptopurina y corticoides).

2.6 CORRELACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS.

Las correlaciones entre los propios factores solubles angiogénicos también fueron analizados. De los resultados, se puede destacar: **(a)** La Ang2 se correlacionó de forma significativa tanto con PlGF ($r = 0,24$, $p < 0,05$), como con su receptor VEGFR1 ($r = 0,25$, $p < 0,05$). **(b)** A su vez, VEGFR1 se correlacionó con ambas angiopoietinas, Ang1 y Ang2 ($r = 0,30$, $p < 0,05$; $r = 0,25$, $p < 0,05$, respectivamente).

2.7. RELACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS Y LOS REACTANTES DE FASE AGUDA (PROTEÍNA C REACTIVA, OROSOMUCOIDE Y FIBRINÓGENO).

La distribución de los niveles séricos de los reactantes de fase aguda de nuestra muestra de estudio seguía una distribución Normal. La *tabla 31* refleja las diferencias significativas de los reactantes de fase aguda cuando se compararon los pacientes con EC y controles sanos. En esta tabla se observa un aumento significativo de la proteína C reactiva en los pacientes con EC, sin que ésta supere los límites de la normalidad¹⁰. En el caso del fibrinógeno no se observaron diferencias significativas. El orosomucoide únicamente se analizó en pacientes con EC, de manera que no se pudo comparar con el nivel en controles sanos.

		N	Media	Desviación estándar
Proteína C reactiva [mg/dl]	Controles	8	0,14	0,08
	Pacientes EC *	52	0,62	0,05
Fibrinógeno [mg/100ml]	Controles	22	283	60
	Pacientes EC	29	320	82
Orosomucoide [mg/dl]	Pacientes EC	52	98	30

Tabla 31. Concentraciones de los reactantes de fase aguda de pacientes con enfermedad de Crohn en remisión y controles sanos.

Abreviaturas: EC (enfermedad de Crohn); * $p < 0,001$

Además, en los pacientes con EC estos parámetros indicadores de inflamación fueron correlacionados con los factores solubles angiogénicos observándose que la concentración sérica del receptor Tie2 estaba asociada de manera estadísticamente significativa con los niveles circulantes del orosomucoide ($r = 0,35$ $p < 0,05$) y fibrinógeno ($r = 0,50$, $p < 0,01$).

2.8. RELACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS Y LAS CONCENTRACIONES DE TIPOS CELULARES CIRCULANTES (PLAQUETAS, NEUTRÓFILOS, LINFOCITOS)

La distribución de las concentraciones circulantes de los tipos celulares analizados (plaquetas, neutrófilos y linfocitos) de nuestra población de estudio seguía una distribución Normal.

Los linfocitos tienen una concentración menor en los pacientes con EC en remisión, mientras que los niveles de neutrófilos, más indicadores de inflamación, están elevados en los pacientes con EC (*tabla 32*).

		N	Media	Desviación estándar
Plaquetas miles/mm ³	Controles	34	234	48
	Pacientes con EC *	62	273	83
Neutrófilos miles/mm ³	Controles	34	3240	823
	Pacientes con EC *	62	4785	1874
Linfocitos miles/mm ³	Controles	34	2131	865
	Pacientes con EC *	62	1640	716

Tabla 32. Concentraciones de los tipos celulares circulantes en pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos.

Abreviaturas: EC (enfermedad de Crohn); * $p < 0,01$

Se realizó una correlación bivariada entre los factores solubles angiogénicos y los tipos celulares circulantes (plaquetas, neutrófilos y linfocitos) en pacientes con EC. Las concentraciones de VEGF estaban correlacionadas con el conteo plaquetario ($r = 0,39$, $p < 0,01$). Tanto el VEGF como la Ang1 se correlacionaron de forma positiva con los neutrófilos ($r = 0,31$, $p < 0,05$; $r = 0,30$, $p < 0,05$) y los linfocitos ($r = 0,26$, $p < 0,05$; $r = 0,25$, $p = 0,05$).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. COMPARACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS ENTRE PACIENTES CON EC EN REMISIÓN Y CONTROLES.

Los sistemas VEGF-PlGF/VEGFR1 y Ang1-Ang2/Tie2 son críticos para la regulación del proceso de neovascularización. Están implicados, bien directa o indirectamente, en gran parte de los mecanismos biológicos necesarios para la angiogénesis. El presente trabajo contribuye a ampliar los conocimientos existentes, aunque escasos, de la expresión circulante de estos dos sistemas en pacientes con EC. De modo que éste es uno de los primeros trabajos en analizar la expresión sérica y posible interrelación entre ambos sistemas angiogénicos de pacientes con EC en remisión.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación muestran que los pacientes con EC en remisión tienen concentraciones de VEGF circulante más elevadas que los individuos sanos (*tabla 24*). Estos resultados no coinciden con aquellos obtenidos por otros grupos de investigación, en los que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica de VEGF cuando se compararon pacientes con EC en remisión y controles sanos^{97, 116, 125}. No obstante, cabe destacar que el número de pacientes en remisión incluidos en estos estudios era menor que el incluido en el presente trabajo. Por otra parte, en estos trabajos previos sí se observaron concentraciones de VEGF significativamente elevadas en pacientes con EC activa, llegando incluso a correlacionarse con el grado de actividad. Por eso los autores proponen una

activación del proceso angiogénico en relación con la actividad de la enfermedad, es decir, en presencia de inflamación. Aunando conocimientos previos y los resultados del presente trabajo podría sugerirse que, aunque la expresión circulante de VEGF se ve influida por la inflamación, parece estar alterada incluso en ausencia clínica y analítica de dicha inflamación.

Como puede observarse en el apartado de resultados (*tabla 24*), existe un aumento en la expresión circulante de VEGFR1 de pacientes con EC en remisión cuando se compara con las concentraciones que reflejan los controles sanos. En la literatura no se han encontrado trabajos en los que se hayan analizado las concentraciones séricas de VEGFR1 de pacientes con EC en remisión. Sin embargo, se ha hallado un trabajo en el que se determinó la expresión tisular de este receptor, pero parece que tal expresión tisular no difiere cuando se comparan pacientes con EC en remisión y controles sanos¹⁰².

La forma soluble de VEGFR1 consiste en el dominio extracelular de VEGFR1 y es resultado de un *splicing* alternativo del mRNA del gen⁴⁷. Podría sugerirse que esta forma soluble regulase la biodisponibilidad de sus ligandos, VEGF y PlGF, mediante su interacción con ellos, anulando así la acción de estos factores de crecimiento y por ende la inhibición de la proliferación de las CE¹²⁶. Además, esta forma soluble podría formar heterodímeros con los receptores transmembrana (VEGFR1 y VEGFR2) expresados en la superficie de las células endoteliales anulando la transducción de señales desencadenada por tales receptores tras la unión de su ligando VEGF⁶¹. Por otra parte, también se ha descrito que la forma soluble de VEGFR1 podría unirse a VEGF protegiéndolo de la acción de las proteasas, alargando así su vida media y por tanto sus actividades.

La elevada expresión de sVEGFR1 en diversos tumores sugiere una función más proactiva de este receptor soluble en el proceso angiogénico^{126, 127}. Y aunque la función exacta de esta forma soluble de VEGFR1 está aún por dilucidar, el aumento de VEGFR1 en suero de pacientes con EC en remisión podría reflejar una anomalía en el equilibrio homeostático en estos pacientes.

Por otra parte, de nuestros resultados se deriva que la concentración de PlGF en pacientes con EC en remisión está más elevada cuando se compara con la concentración sérica de PlGF de controles sanos (*tabla 24*). Esto coincide con trabajos previos en los que se observó una sobreexpresión de PlGF en la mucosa intestinal de adolescentes con EC quiescente¹²⁸.

Derivado de diversas investigaciones recientes¹²⁹, puede sugerirse que PlGF juega un papel crítico en la angiogénesis patológica, ya que:

- PlGF puede modular o potenciar la respuesta angiogénica mediante su unión con VEGF dando lugar a heterodímeros PlGF/VEGF o también mediante el impedimento de la unión VEGF-VEGFR1 (receptor común de ambos ligandos). De esta forma, existiría una mayor cantidad de VEGF disponible para unirse con el receptor tipo tirosin cinasa VEGFR2, a través del cual desencadena la mayoría de sus funciones angiogénicas. Además, se ha descrito que el homodímero PlGF/PlGF y el heterodímero PlGF/VEGF podrían jugar un papel crítico en la supervivencia de las CE, ya que regulan la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 a través de la ruta de señalización de PI3K. Así, el PlGF podría contribuir al crecimiento microvascular aberrante observado durante la angiogénesis patológica¹³⁰.

- Tras la unión de PlGF con su receptor tipo tirosin cinasa VEGFR1, parece existir una transducción de señales que deriva en la activación de la angiogénesis.
- Parece que PlGF también tiene efectos quimiotácticos para determinadas células inflamatorias.

De esta manera, PlGF contribuye a una angiogénesis patológica y por consiguiente podría favorecer la inflamación intestinal a través de la ampliación de las actividades de VEGF. Así como el VEGF está implicado tanto en la angiogénesis fisiológica como patológica, el PlGF podría restringirse a la patológica.

El sistema Ang1-Ang2/Tie2 principalmente implicado en la maduración y reestructuración del entramado vascular, permanece en un segundo plano, ya que el papel protagonista en la regulación del proceso angiogénico ha recaído clásicamente sobre el sistema VEGF/VEGFR.

Existe un estudio previo en el que se analizaron las concentraciones séricas de Ang2 y Tie2 en pacientes con EC en remisión, observándose mayores niveles circulantes de ambas proteínas cuando se compararon con las concentraciones séricas de controles sanos¹³¹. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo de investigación (*tabla 24*). Por su parte, la concentración de Ang1 en suero de pacientes con EC no ha sido determinada hasta el momento, a excepción de nuestro grupo de trabajo, observándose niveles menores en controles sanos que en pacientes con EC en remisión^{96, 132}.

Así, en el presente estudio se observa que, mientras las concentraciones de Ang2 y Tie2 estaban significativamente elevadas en pacientes con EC quiescente

comparados con controles sanos, ocurría lo contrario con Ang1. Esto supone un desequilibrio de la relación Ang2/Ang1, lo que podría reflejar un proceso anómalo de la maduración y estabilización de la microvasculatura intestinal. Estas dos proteínas han de mantener un equilibrio en su expresión y actividad, ya que sus funciones son opuestas y se contrarrestan. Por un lado, Ang1 estabiliza el entramado microvascular, mediando en la interacción CE-pericito; por el contrario, la Ang2 está implicada en la desestabilización de la microvasculatura. Además, este resultado es apoyado en diversos trabajos, en los que se sugiere que una secreción aumentada de Ang2 por el endotelio actúa de una manera autocrina perturbando la interacción entre Ang1 y Tie2, y por lo tanto, alterando la maduración y estabilización de la microvascular^{71, 121}.

2. COMPARACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS EN PACIENTES CON EC EN REMISIÓN CLASIFICADOS SEGÚN SU PATRÓN FENOTÍPICO.

Debido al papel de VEGF en la fibrogenesis¹³³, el estudio de las posibles diferencias en los factores solubles angiogénicos en pacientes con EC en remisión clasificados según el comportamiento de su enfermedad era uno de los principales objetivos del presente trabajo. La finalidad era encontrar un posible marcador, que pudiera predecir la evolución de estos pacientes y así poder seleccionar precozmente el tratamiento más adecuado.

A pesar de que las concentraciones de VEGF y de Ang2 se encontraban más elevadas en los pacientes con un perfil de enfermedad estenosante, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (*tabla 25*). Tampoco se

observaron diferencias en el resto de factores solubles angiogénicos cuando se compararon los pacientes con un patrón fenotípico inflamatorio o estenosante. Por otra parte, la presencia de fistulas no parecía modular las concentraciones séricas de los factores angiogénicos determinados (*tabla 27*). Únicamente se observó una disminución del receptor de angiopoietinas Tie2 en las fistulas internas, lo que podría apuntar a una regulación anómala del sistema Ang1-Ang2/Tie2, y por tanto de la maduración microvascular (*tabla 28*).

Mientras que el análisis de los factores solubles angiogénicos parece ser útil en la hepatitis crónica C, sugiriendo a tales factores como posibles biomarcadores de fibrosis¹³⁴, los resultados obtenidos en el presente trabajo pondrían en duda su utilidad en pacientes con EC. No obstante, con el fin de paliar la baja potencia estadística, se precisarían futuros estudios con una mayor cohorte de pacientes, ya que existe una tendencia al aumento de las concentraciones de VEGF y Ang2 en pacientes con fenotipo estenosante cuando se comparan con pacientes cuyo comportamiento de la enfermedad es inflamatorio o fistulizante.

3. EVALUACIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS EN PACIENTES CON EC EN REMISIÓN SEGÚN VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS.

Existen diversas variables clínicas que podrían influir en la expresión de los factores solubles angiogénicos, ya que algunas de ellas representan factores de riesgo ambientales.

El tabaco en la EC se ha identificado como un potente factor de riesgo, directamente asociado a su aparición^{135, 136}, favoreciendo una peor evolución clínica con mayor número de brotes^{6, 137}. Así, en el presente trabajo se compararon los niveles de los factores solubles angiogénicos entre pacientes con EC fumadores y no fumadores; sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que el efecto pernicioso del tabaco no está mediado por la activación de la angiogénesis.

Estudios realizados en familias o en gemelos con EC indican que hay una predisposición genética elevada¹³⁸. Además, se han identificado numerosos genes susceptibles a la EC, como sería el caso de CARD15, DLG5, OCTN1, NOD1¹³⁹. Por eso se analizaron los factores angiogénicos en pacientes en función de sus antecedentes familiares de enfermedad inflamatoria intestinal, encontrando que estos pacientes tenían niveles significativamente menores de VEGFR1 y Ang2 en comparación con pacientes sin antecedentes familiares de enfermedad inflamatoria intestinal. No se ha encontrado bibliografía en relación a este tema que pueda explicar tales anomalías de forma fundamentada. Sin embargo, ambas proteínas presentan una función dual en el proceso angiogénico, pudiendo actuar como factores proangiogénicos o antiangiogénicos, dependiendo de su forma fisiológica o de la presencia de otros factores angiogénicos.

Existen estudios en los que se describe la apendicectomía como factor de riesgo para el desarrollo de la EC¹⁴⁰⁻¹⁴². Cuando se compararon las concentraciones de factores solubles angiogénicos entre pacientes que habían sido o no apendicectomizados, se observó que únicamente el PlGF mostraba valores significativamente menores en aquellos pacientes que habían sido operados de

apéndice. Los menores niveles de PlGF podrían apuntar a la existencia de una disminución de la competitividad de PlGF y VEGF por la interacción con el receptor común para ambos ligandos, VEGFR1. Así el VEGF desencadenaría sus acciones biológicas tras su unión a VEGFR1.

El hecho de haber sufrido una colectomía podría producir variaciones en los factores angiogénicos. Tras una intervención quirúrgica, los tejidos se regeneran generalmente mediante la activación de la angiogénesis fisiológica, que en el caso de estos pacientes podría perpetuarse dando lugar a una angiogénesis anómala (*figura 1*). Por estas razones, parecía interesante estudiar posibles variaciones de los factores angiogénicos en aquellos pacientes que fueron total o parcialmente colectomizados. Sin embargo no mostraron variaciones estadísticamente significativas.

Se ha observado que entre un 25-35% (en nuestro estudio un 21%) de los pacientes con EC presentan manifestaciones extradigestivas¹⁴³. Estas manifestaciones pueden preceder, acompañar o comportarse de forma independiente de la enfermedad intestinal subyacente¹⁴³. Los niveles de la Ang2 eran menores en aquellos pacientes con EC que presentaban alguna manifestación extraintestinales (articular o cutánea). No se ha encontrado bibliografía referida a la relación de Ang2 con enfermedades cutáneas y osteoarticulares más frecuentes en pacientes con EC¹⁴³. Serían necesarios futuros estudios para confirmar si este factor de supervivencia Ang2 juega algún papel en la presencia o ausencia de manifestaciones extraintestinales en pacientes con EC en remisión.

Las CE representan un componente potencialmente activo en el sistema inmune, ya que existe un nexo entre las CE y las células del sistema inmune, las

cuales están también íntimamente relacionadas con la regulación de la formación de los vasos sanguíneos y de su función. Así, por ejemplo, los macrófagos son capaces de producir VEGF y MMP, tras un estímulo de hipoxia^{144, 145}. Y por su parte, los neutrófilos actúan como fuente de VEGF, induciendo su liberación tanto en la angiogénesis fisiológica como patológica¹⁴⁶. Debido a esta relación entre moléculas del sistema inmune y la angiogénesis^{3, 147}, hemos analizado los factores angiogénicos de aquellos pacientes con alergias sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. De modo que no parece existir alteración en los niveles de los factores angiogénicos en aquellos pacientes que muestran hipersensibilidad inmunológica a factores externos.

El hecho de que los niveles de factores solubles angiogénicos no varíen con recibir o no tratamiento de mantenimiento, ni con el tipo de tratamiento, sugiere que estas concentraciones no se ven alteradas con la ingesta de los fármacos de mantenimiento, como ya reflejan otros marcadores biológicos como es el caso de la proteína C reactiva¹⁰.

Parece que la edad de diagnóstico de la enfermedad no influye sobre los niveles de los mediadores angiogénicos, aunque sí se observaron mayores concentraciones de VEGF y Ang2 en aquellos pacientes que fueron diagnosticados a una edad superior a los 40 años. Adicionalmente, serían necesarios estudios en los que se analizaran los niveles de factores angiogénicos en pacientes pediátricos (según la clasificación de Montreal < 17 años), por si pudiera existir alguna alteración de los mediadores implicados en el proceso angiogénico en este grupo de pacientes, que podrían ser más susceptibles a sufrir complicaciones a lo largo de la evolución de su enfermedad.

Asimismo, los resultados indican una menor concentración del VEGFR1 en la localización de la EC en el tracto digestivo alto. Esta localización suele asociarse a lesiones de carácter inflamatorio con poca traducción clínica¹⁶. Por ello, posteriores estudios con una mayor cohorte de pacientes podrían ser de ayuda para dilucidar si la expresión de VEGFR1 se ve alterada en esta localización de la enfermedad, y poder encontrar así un posible biomarcador.

4. RELACIÓN DE LOS REACTANTES DE FASE AGUDA Y TIPOS CELULARES CIRCULANTES CON LOS FACTORES SOLUBLES ANGIOGÉNICOS.

La EC es un trastorno inflamatorio que también conlleva anomalías en la estructura o en la función de determinadas células sanguíneas, tales como las plaquetas o los neutrófilos^{2, 148, 149}. De ahí que se hayan observado variaciones significativas en las concentraciones de determinados tipos celulares (plaquetas, linfocitos y neutrófilos) y de reactantes de fase aguda que reflejan inflamación (proteína C reactiva, orosomucoide y fibrinógeno) entre los pacientes con EC en remisión y controles sanos incluidos en el presente trabajo (*tabla 31 y 32*).

Tanto la inflamación como el sistema inmune parecen estar regulados por moléculas que también juegan un papel crucial en el proceso de angiogénesis^{27, 146}. La Ang2 puede modular la respuesta inflamatoria, ya que sensibiliza a las CE a la acción de TNF α y de VEGF, revelándose una ruta de transducción de señales en común para la inflamación y la angiogénesis^{150, 151}. Además, tanto las angiopoietinas como el PlGF ejercen acciones quimiotácticas sobre los neutrófilos favoreciendo su migración, y por tanto la inflamación^{129, 150}. A pesar de esto, el

hecho de que la angiogénesis observada pudiera deberse únicamente a la propia inflamación podría ser descartado, ya que en este trabajo únicamente se incluyeron pacientes en remisión con este propósito. De modo que el proceso angiogénico podría ser por sí solo una consecuencia de la enfermedad y a su vez la causa, debido a una retroalimentación entre los procesos de inflamación crónica y angiogénesis.

Como resultado de esta relación entre inflamación, sistema inmune y proceso angiogénico, en el presente trabajo también se evaluó la asociación entre los factores solubles angiogénicos, reactantes en fase aguda y determinadas células sanguíneas circulantes (plaquetas, linfocitos y neutrófilos). Así, se observó una correlación positiva del VEGF con el número de plaquetas, neutrófilos y linfocitos circulantes, lo que podría apuntar a que estos tipos celulares son fuentes de almacenamiento de VEGF, y son los responsables de su secreción en determinadas circunstancias; hecho apoyado en estudios previos realizados *in vitro*^{152, 153}. Los resultados de este trabajo indican que la Ang1 parece relacionarse con la concentración circulante de neutrófilos, tal y como se sugiere en estudios previos¹⁵⁴. Asimismo, la forma soluble del receptor tipo tirosin cinasa Tie2 se correlacionaba con los mediadores que reflejan inflamación, es decir, los reactantes de fase aguda. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios previos en los que, en concreto, el Tie2 se relaciona con el proceso de inflamación^{134, 154}.

En otros trabajos se ha observado una asociación entre VEGF, PlGF y angiopoietinas, cuyas actividades parecen depender de la expresión de otros factores angiogénicos^{27, 71, 155}. Así, la sobreexpresión de PlGF produce un aumento

en los niveles de las isoformas 121 y 165 de VEGF, dando lugar a la formación de nuevos vasos⁵⁷. Por su parte, diversos trabajos apuntan que la presencia de VEGF influye en la actividad proangiogénica de la Ang2^{83, 84}. De modo que en presencia del VEGF, Ang2 promueve la proliferación endotelial y la migración, lo que facilita la remodelación de la neovasculatura^{122, 131}. Además, la infiltración de macrófagos y efectos de quimiotaxis en monocitos, tanto de VEGFR1^{47, 67} como del PlGF⁵⁹, podría contribuir a la sobreexpresión de VEGF.

Por estas razones, en este trabajo se determinaron las correlaciones entre los factores angiogénicos, observándose que los niveles de Ang2 estaban correlacionados de manera significativa y positiva con la expresión circulante de PlGF y VEGFR1. Por su parte, la concentración de Ang1 también correlacionaba de forma positiva y estadísticamente significativa con VEGFR1. De manera que se podría suponer una interacción entre ambos sistemas angiogénicos, VEGF-PlGF/VEGFR1 y Ang1-Ang2/Tie2. Sin embargo, serían necesarios estudios adicionales *in vitro* para determinar dicha correlación en la expresión de estos mediadores angiogénicos. Además, esto podría sugerir la regulación que ejercen unos factores sobre otros, siendo esto de utilidad para futuras terapias, en las que un mismo fármaco presente más de una diana terapéutica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En los pacientes con enfermedad de Crohn en remisión se observaron alteraciones en las concentraciones circulantes de VEGF-PlGF/VEGFR1 y Ang1-Ang2/Tie2, lo que sugiere una posible regulación anómala de la homeostasis microvascular, que podría estar implicada en la patogénesis de esta enfermedad.
2. Las concentraciones de los factores angiogénicos en función del comportamiento clínico de su enfermedad (inflamatorio, estenosante y fistulizante) no mostraron diferencias estadísticamente significativas, lo que cuestiona el uso de estos factores como posibles biomarcadores de la evolución fenotípica de la enfermedad de Crohn.
3. Las correlaciones observadas entre las concentraciones de los diversos factores solubles angiogénicos, reactantes de fase aguda (proteína C reactiva, orosomucoide y fibrinógeno) y tipos celulares circulantes (plaquetas, neutrófilos y linfocitos) podrían reflejar la existencia de rutas de señalización comunes entre el proceso angiogénico, la inflamación y el sistema inmune.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007; 369: 1641-57.
2. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205.
3. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4807-12.
4. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 371-82.
5. Sicilia-Aladrén B, Gassull MA, Gomollón F. Epidemiología de las enfermedades inflamatorias intestinales. Factores ambientales internos y externos en su patogenia. En: *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. Ed: M. A. Gassull, F. Gomollón, J. Hinojosa, A. Obrador. III Edición. Ediciones Aran, S.L. 2007.
6. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004; 3: 394-400.
7. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006; 55 Suppl 1: i1-15.
8. Vermeire S, van Assche G, Rutgeerts P. Review article: Altering the natural history of Crohn's disease--evidence for and against current therapies. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 3-12.
9. Nos P, Clofent-Villaplana J. Enfermedad de Crohn. En: *Tratamiento de las enfermedades gastroenterológicas*. Ed: J. Ponce García. II Edición. SCM, S.L. ; 2006.
10. Gisbert JP, Gonzalez-Lama Y, Mate J. [Role of biological markers in inflammatory bowel disease.]. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 117-29.
11. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 8-15.
12. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A: 5-36.

13. Gomollon F, Ber-Nieto Y. Enfermedad de Crohn: diagnóstico, valoración de la actividad y clasificación 2006. En: Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Ed: J. Balanzó y E. Ricart. ICG Marge, S.L.; 2006, Barcelona.
14. Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W. American Gastroenterological Association Institute medical position statement on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; 130: 935-9.
15. Hanauer SB, Sandborn W. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 635-43.
16. Esteve M, Rosinach-Ribera M, Loras-Alastruey C. Tratamiento general del brote de enfermedad de Crohn. En: Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Ed: M. A. Gassull, F. Gomollón, J. Hinojosa, A. Obrador. III Edición. Ediciones Aran, S.L. 2007.
17. Morson BC, Lockhart-Mummery HE. Anal lesions in Crohn's disease. *Lancet* 1959; 2: 1122-3.
18. Rotholtz N, Bun M. Tratamiento quirúrgico de la enfermedad de Crohn: cuándo operar y cómo. En: Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Ed: M. A. Gassull, F. Gomollón, J. Hinojosa, A. Obrador. III Edición. Ediciones Aran, S.L. 2007.
19. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-6.
20. Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2007; 10: 149-66.
21. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-4.
22. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-57.
23. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-60.
24. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
25. Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3: S81-90.
26. Creamer D, Sullivan D, Bicknell R, Barker J. Angiogenesis in psoriasis. *Angiogenesis* 2002; 5: 231-6.
27. Beat A Imhof MA-L. Angiogenesis and inflammation face off. *Nat Med* 2006; 12: 171-172.

28. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-95.
29. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-8.
30. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-8.
31. Danese S, Scaldaferri F, Vetrano S, Stefanelli T, Graziani C, Repici A, et al. Critical role of the CD40 CD40-ligand pathway in regulating mucosal inflammation-driven angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; 56: 1248-56.
32. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-76.
33. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *Embo J* 2001; 20: 1223-31.
34. Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 1997; 91: 695-704.
35. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26: 25-35.
36. Enholm B, Karpanen T, Jeltsch M, Kubo H, Stenback F, Prevo R, et al. Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor-C induces lymphangiogenesis in the skin. *Circ Res* 2001; 88: 623-9.
37. Baldwin ME, Stacker SA, Achen MG. Molecular control of lymphangiogenesis. *Bioessays* 2002; 24: 1030-40.
38. Dejana E, Spagnuolo R, Bazzoni G. Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb Haemost* 2001; 86: 308-15.
39. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5: 623-8.
40. Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 10002-7.

41. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 13313-6.
42. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 781-8.
43. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 1999; 18: 2221-30.
44. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 2000; 87: 677-82.
45. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002; 200: 581-97.
46. Angelo LS, Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2825-30.
47. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006; 580: 2879-87.
48. Hoenig MR, Bianchi C, Sellke FW. Hypoxia inducible factor-1 alpha, endothelial progenitor cells, monocytes, cardiovascular risk, wound healing, cobalt and hydralazine: a unifying hypothesis. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 422-35.
49. Failla CM, Odorisio T, Cianfarani F, Schietroma C, Puddu P, Zambruno G. Placenta growth factor is induced in human keratinocytes during wound healing. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 388-95.
50. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, et al. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *Faseb J* 2006; 20: 1495-7.
51. Wei SC, Tsao PN, Yu SC, Shun CT, Tsai-Wu JJ, Wu CH, et al. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. *Gut* 2005; 54: 666-72.
52. Lacal PM, Failla CM, Pagani E, Odorisio T, Schietroma C, Falcinelli S, et al. Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 1000-7.
53. Donnini S, Machein MR, Plate KH, Weich HA. Expression and localization of placenta growth factor and PlGF receptors in human meningiomas. *J Pathol* 1999; 189: 66-71.

54. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 38: 258-68.
55. Taylor AP, Goldenberg DM. Role of placenta growth factor in malignancy and evidence that an antagonistic PlGF/Flt-1 peptide inhibits the growth and metastasis of human breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 524-31.
56. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003; 9: 936-43.
57. Roy H, Bhardwaj S, Babu M, Jauhiainen S, Herzig KH, Bellu AR, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 1422-8.
58. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, et al. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* 2003; 92: 378-85.
59. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen--a review. *Placenta* 2000; 21 Suppl A: S16-24.
60. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277: 48-50.
61. Hornig C, Weich HA. Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* 1999; 3: 33-9.
62. Clauss M. Functions of the VEGF receptor-1 (FLT-1) in the vasculature. *Trends Cardiovasc Med* 1998; 8: 241-5.
63. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 1096-103.
64. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.
65. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26988-95.
66. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 2004; 113: 1040-50.

67. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87: 3336-43.
68. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res* 2002; 62: 2749-52.
69. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006; 441: 437-43.
70. Niedzwiecki S, Stepień T, Kopec K, Kuzdak K, Komorowski J, Krupinski R, et al. Angiopoietin 1 (Ang-1), angiopoietin 2 (Ang-2) and Tie-2 (a receptor tyrosine kinase) concentrations in peripheral blood of patients with thyroid cancers. *Cytokine* 2006; 36: 291-5.
71. Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4241-5.
72. Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 257-67.
73. Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, Choi HH, Kim KT, Ahn SY, et al. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *Faseb J* 2004; 18: 1200-8.
74. Stratmann A, Risau W, Plate KH. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153: 1459-66.
75. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171-80.
76. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999; 286: 2511-4.
77. Bach F, Uddin FJ, Burke D. Angiopoietins in malignancy. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 7-15.
78. Shim WS, Ho IA, Wong PE. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 655-65.
79. Ahmad SA, Liu W, Jung YD, Fan F, Wilson M, Reinmuth N, et al. The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 1255-9.

80. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002; 129: 4797-806.
81. Tait CR, Jones PF. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J Pathol* 2004; 204: 1-10.
82. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 2002; 3: 411-23.
83. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 11205-10.
84. Gale NW, Thurston G, Davis S, Wiegand SJ, Holash J, Rudge JS, et al. Complementary and coordinated roles of the VEGFs and angiopoietins during normal and pathologic vascular formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002; 67: 267-73.
85. Peters KG, Kontos CD, Lin PC, Wong AL, Rao P, Huang L, et al. Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59: 51-71.
86. Lin P, Buxton JA, Acheson A, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, et al. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 8829-34.
87. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 507-21.
88. Pousa ID, Gisbert JP, Mate J. [Vascular development in inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 414-21.
89. Pousa ID, Mate J, Gisbert JP. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 73-81.
90. Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, et al. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 2060-73.
91. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1649-60.
92. Okuda T, Azuma T, Ohtani M, Matsunaga S, Masaki R, Satomi S, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor expression in ischaemic colitis and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24 (Suppl 4): 182-8.

93. Giatromanolaki A, Sivridis E, Maltezos E, Papazoglou D, Simopoulos C, Gatter KC, et al. Hypoxia inducible factor 1alpha and 2alpha overexpression in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 2003; 56: 209-13.
94. Koutroubakis IE, Tsiolakidou G, Karmiris K, Kouroumalis EA. Role of angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 515-23.
95. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 550-63.
96. Pousa ID, Mate J, Salcedo-Mora X, Abreu MT, Moreno-Otero R, Gisbert JP. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin systems in serum of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 61-7.
97. Griga T, Tromm A, Spranger J, May B. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 504-8.
98. Griga T, Werner S, Koller M, Tromm A, May B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Crohn's disease: increased production by peripheral blood mononuclear cells and decreased VEGF165 labeling of peripheral CD14+ monocytes. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1196-201.
99. Griga T, Voigt E, Gretzer B, Brasch F, May B. Increased production of vascular endothelial growth factor by intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 920-3.
100. Griga T, Gutzeit A, Sommerkamp C, May B. Increased production of vascular endothelial growth factor by peripheral blood mononuclear cells in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 175-9.
101. Magro F, Araujo F, Pereira P, Meireles E, Diniz-Ribeiro M, Velosom FT. Soluble selectins, sICAM, sVCAM, and angiogenic proteins in different activity groups of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1265-74.
102. Konno S, Iizuka M, Yukawa M, Sasaki K, Sato A, Horie Y, et al. Altered expression of angiogenic factors in the VEGF-Ets-1 cascades in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2004; 39: 931-9.
103. Ferrante M, Pierik M, Henckaerts L, Joossens M, Claes K, Van Schuerbeek N, et al. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 870-8.

104. Ginsburg PM, Dassopoulos T, Ehrenpreis ED. Thalidomide treatment for refractory Crohn's disease: a review of the history, pharmacological mechanisms and clinical literature. *Ann Med* 2001; 33: 516-25.
105. Ko HM, Park YM, Jung B, Kim HA, Choi JH, Park SJ, et al. Involvement of matrix metalloproteinase-9 in platelet-activating factor-induced angiogenesis. *FEBS Lett* 2005; 579: 2369-75.
106. Stumpf M, Cao W, Klinge U, Klosterhalfen B, Junge K, Krones CJ, et al. Reduced expression of collagen type I and increased expression of matrix metalloproteinases 1 in patients with Crohn's disease. *J Invest Surg* 2005; 18: 33-8.
107. Gao Q, Meijer MJ, Kubben FJ, Sier CF, Kruidenier L, van Duijn W, et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in intestinal tissue of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 584-92.
108. Arihiro S, Ohtani H, Hiwatashi N, Torii A, Sorsa T, Nagura H. Vascular smooth muscle cells and pericytes express MMP-1, MMP-9, TIMP-1 and type I procollagen in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 2001; 39: 50-9.
109. Rickert D, Lendlein A, Kelch S, Moses MA, Franke RP. Expression of MMPs and TIMPs in primary epithelial cell cultures of the upper aerodigestive tract seeded on the surface of a novel polymeric biomaterial. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005; 32: 117-28.
110. Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 2004; 53: 701-9.
111. Miseljic S, Galandiuk S, Myers SD, Wittliff JL. Expression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in colon disease. *J Clin Lab Anal* 1995; 9: 413-7.
112. Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1135-57.
113. Griga T, May B, Pfisterer O, Muller KM, Brasch F. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 116-23.
114. Srivastava M, Zurakowski D, Cheifetz P, Leichtner A, Bousvaros A. Elevated serum hepatocyte growth factor in children and young adults with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 548-53.
115. Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, Sfiridaki A, Kandidaki E, Kouroumalis EA. Serum angiogenin in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1758-62.

116. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima T, Kagiya M, Kikuchi K. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 822-8.
117. Feral CC, Rose DM, Han J, Fox N, Silverman GJ, Kaushansky K, et al. Blocking the alpha 4 integrin-paxillin interaction selectively impairs mononuclear leukocyte recruitment to an inflammatory site. *J Clin Invest* 2006; 116: 715-23.
118. Macdonald J, McDonald J. Natalizumab for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; CD006097.
119. Sans M, Danese S, de la Motte C, de Souza HS, Rivera-Reyes BM, West GA, et al. Enhanced recruitment of CX3CR1+ T cells by mucosal endothelial cell-derived fractalkine in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 139-53.
120. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003; 111: 1287-95.
121. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005; 97: 512-23.
122. Hagedorn M, Balke M, Schmidt A, Bloch W, Kurz H, Javerzat S, et al. VEGF coordinates interaction of pericytes and endothelial cells during vasculogenesis and experimental angiogenesis. *Dev Dyn* 2004; 230: 23-33.
123. Sachar DB, Bodian CA, Goldstein ES, Present DH, Bayless TM, Picco M, et al. Is perianal Crohn's disease associated with intestinal fistulization? *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1547-9.
124. Aceituno-Quintanilla M, Panes J. Tratamiento de la enfermedad de Crohn en relación al fenotipo. En: *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. Ed: M. A. Gassull, F. Gomollón, J. Hinojosa, A. Obrador. III Edición. Ediciones Aran, S.L. 2007.
125. Kapsoritakis A, Sfiridaki A, Maltezos E, Simopoulos K, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Vascular endothelial growth factor in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 418-22.
126. Wierzbowska A, Robak T, Wrzesien-Kus A, Krawczynska A, Lech-Maranda E, Urbanska-Rys H. Circulating VEGF and its soluble receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in patients with acute leukemia. *Eur Cytokine Netw* 2003; 14: 149-53.
127. Purpura KA, George SH, Dang SM, Choi K, Nagy A, Zandstra PW. Soluble FLT-1 regulates Flk-1 activation to control hematopoietic and endothelial development in an oxygen responsive manner. *Stem Cells* 2008.

128. Kader HA, Tchernev VT, Satyaraj E, Lejnine S, Kotler G, Kingsmore SF, et al. Protein microarray analysis of disease activity in pediatric inflammatory bowel disease demonstrates elevated serum PLGF, IL-7, TGF-beta1, and IL-12p40 levels in Crohn's disease and ulcerative colitis patients in remission versus active disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 414-23.
129. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7: 575-83.
130. Cai J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, et al. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes* 2003; 52: 2959-68.
131. Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, Sfiridaki A, Kandidaki E, Kouroumalis EA. Potential role of soluble angiopoietin-2 and Tie-2 in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 127-32.
132. Pousa ID, Maté J, Salcedo-Mora X, Abreu M, Moreno-Otero R, Gisbert JP. Analysis of soluble angiogenic factors in Crohn's disease: A preliminary study. *Gastroenterol Hepatol* 2007.
133. Beddy D, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Increased vascular endothelial growth factor production in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *Br J Surg* 2004; 91: 72-7.
134. Salcedo X, Medina J, Sanz-Cameno P, Garcia-Buey L, Martin-Vilchez S, Borque MJ, et al. The potential of angiogenesis soluble markers in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 42: 696-701.
135. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 1841-54.
136. Regueiro M, Kip KE, Cheung O, Hegazi RA, Plevy S. Cigarette smoking and age at diagnosis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 42-7.
137. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugier L, Le Quintrec Y, Gendre JP. Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1996; 110: 424-31.
138. Henckaerts L, Vermiere S. Genética de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. Ed: M. A. Gassull, F. Gomollón, J. Hinojosa, A. Obrador. III Edición. Ediciones Aran, S.L. 2007.

139. Sturm A. Optimizing medical therapy in inflammatory bowel disease. En: *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. Ed: J. Balanzó y E. Ricart. ICG Marge, S.L.; 2006, Barcelona.
140. Kaplan GG, Pedersen BV, Andersson RE, Sands BE, Korzenik J, Frisch M. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a population-based cohort study in Sweden and Denmark. *Gut* 2007; 56: 1387-92.
141. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 40-6.
142. Gilat T, Hachohen D, Lilos P, Langman MJ. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 1009-24.
143. Rivera-Irigoín R, Ubiña-Aznar E, Sánchez-Cantos A. *Enfermedad Inflamatoria Crónica Intestinal*. En: *Manual del Residente de Aparato Digestivo*. Ed: A. Caballero. ENE Publicidad; 2005, Madrid.
144. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol* 2005; 175: 6257-63.
145. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-74.
146. Noonan DM, De Lerna Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albin A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 31-40.
147. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol* 2007; 178: 6017-22.
148. Danese S. Inflammation and the mucosal microcirculation in inflammatory bowel disease: the ebb and flow. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 384-9.
149. Kayo S, Ikura Y, Suekane T, Shirai N, Sugama Y, Ohsawa M, et al. Close association between activated platelets and neutrophils in the active phase of ulcerative colitis in humans. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 727-35.
150. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- α and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006; 12: 235-9.
151. Pfaff D, Fiedler U, Augustin HG. Emerging roles of the Angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 719-26.

152. Kellouche S, Mourah S, Bonnefoy A, Schoevaert D, Podgorniak MP, Calvo F, et al. Platelets, thrombospondin-1 and human dermal fibroblasts cooperate for stimulation of endothelial cell tubulogenesis through VEGF and PAI-1 regulation. *Exp Cell Res* 2007; 313: 486-99.
153. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology* 2006; 147: 1278-86.
154. Lemieux C, Maliba R, Favier J, Theoret JF, Merhi Y, Sirois MG. Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* 2005; 105: 1523-30.
155. Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003; 314: 61-8.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

1. ARTÍCULOS PUBLICADOS

1. **ID Pousa**, JP Gisbert, J Maté. El desarrollo vascular en la enfermedad inflamatoria intestinal. GASTROENTEROL HEPATOL, 2006; 29(7):414-421.
2. **ID Pousa**, JP Gisbert. Angiogénesis gástrica e infección por *Helicobacter pylori*. REV ESP ENF DIG, 2006; 98:527-541.
3. **Dueñas Pousa I**, J Maté, X Salcedo-Mora, M Abreu, R Moreno-Otero, JP Gisbert. Analysis of soluble angiogenic factors in Crohn's disease: A preliminary study. GASTROENTEROL HEPATOL, 2007; 30(9):518-24.
4. **ID Pousa**, J Maté, X Salcedo-Mora, M Abreu, R Moreno-Otero, JP Gisbert. Role of the vascular endotelial growth factor (VEGF) and angiopoietin systems in serum of Crohn's Disease patients. INFLAM BOWEL DIS, 2008; 14(1):61-67.
5. **ID Pousa**, J Maté, JP Gisbert. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. EUR J CLIN INVEST, 2008; 38(2):73-81.

2. COMUNICACIONES A CONGRESO

1. **ID Pousa**, A Algaba, R Moreno-Otero, J Maté, F Bermejo, JP Gisbert. Corticoid's effects on angiogenic factors levels in ulcerative colitis (UC) patients. European Crohn's and Colitis Organization (ECCO). Febrero-Marzo, 28-1, 2008 [Abstract].
2. **ID Pousa**, J Maté, X Salcedo, R Moreno-Otero, JP Gisbert. Papel de las angiopoietinas (Angs) en pacientes con enfermedad de Crohn (EC). Asociación Española Gastroenterología (AEG). Marzo 29-31, 2007. Madrid-España. Gastroenterol Hepatol. 2007; 30(3):194. [Abstract].
3. **ID Pousa**, J Maté, X Salcedo, R Moreno-Otero, JP Gisbert. Los patrones fenotípicos en pacientes con enfermedad de Crohn no difieren según factores angiogénicos solubles. Asociación Española Gastroenterología (AEG). Marzo 29-31, 2007. Madrid-España. Gastroenterol Hepatol. 2007; 30(3):194. [Abstract].
4. **ID Pousa**, ME Fernández-Contreras, M Lozano, B Herráez, C Gamallo, J Maté y JP Gisbert. Polimorfismos del gen de timidilato sintasa en pacientes con colitis ulcerosa (CU). Asociación Española Gastroenterología (AEG). Marzo 29-31, 2007. Madrid-España. Gastroenterol Hepatol. 2007; 30(3):194. [Abstract].
5. **ID Pousa**, J Maté, X Salcedo, R Moreno-Otero, JP Gisbert. Angiogenic soluble Factors (ASFs) in Crohn's Disease (CD). [Abstract]. United European Gastroenterology Week (UEGW). Supplement to Gut. October 2006; 55(Suppl V) A106. Octubre 21-25, 2006. Berlin (Alemania). [Abstract].
6. X Salcedo-Mora, JP Gisbert, **ID Pousa** and R Moreno-Otero. Hepatitis C and inflammatory bowel disease. IV International Meeting on

Immunology and the Liver: Inflammation, repair and therapies. Septiembre 21-22, 2006. Madrid. [Comunicación oral]

7. **ID Pousa**, J Maté, X Salcedo, R Moreno-Otero, JP Gisbert. Angiogenic soluble Factors (ASF) in Patients with Crohn's Disease According to Their Pathological Behaviour. Digestive Disease Week. Mayo 20-25, 2006. Los Angeles, CA. Supplement to Gastroenterology. April 2006; 130(4) Suppl 2: A-697. [Abstract].
8. M Velasco, **ID Pousa**, J Maté, X Salcedo, R Moreno-Otero, JP Gisbert. Analysis of angiogenic soluble factors (ASF) in patients with Crohn's disease (CD). Sixth ESH Interdisciplinary Euroconference on Angiogenesis. 13-16 Mayo, 2006. Mandelieu (Cannes)-Francia. [Abstract].
9. **ID Pousa**, J Maté, X Salcedo, R Moreno-Otero, JP Gisbert. Factores angiogénicos solubles relacionados con el patrón evolutivo en pacientes con enfermedad de Crohn. Asociación Española Gastroenterología (AEG). Marzo 9-11, 2006. Madrid-España. Gastroenterol Hepatol. 2006; 29(3):169. [Póster seleccionado para presentación oral].
10. **ID Pousa**, J Maté, X Salcedo, R Moreno-Otero, JP Gisbert. Análisis de los factores angiogénicos solubles en pacientes con enfermedad de Crohn. AEG. Marzo 9-11, 2006. Madrid-España. Gastroenterol Hepatol. 2006; 29(3):183. [Abstract].
11. **ID Pousa**, P Sanz-Cameno, X Salcedo-Mora, J Medina, S Martín-Vílchez, L García-Buey, M Trapero, E Gómez-Domínguez, JA Moreno-Monteagudo, MJ Borque, S Rubio, J Mendoza, J Legido, JP Gisbert, R Moreno-Otero. Analysis of angiogenesis soluble factor (ASF) in chronic hepatitis C (CHC). Fifth ESH Euroconference on Angiogenesis. May 27-30, 2005. Sitges-España. Poster 29. [Abstract].